Fabíola Santos Zambon Robertoni

**Estudo das fibras constituintes da matriz extracelular e
da expressão de metaloproteases durante o
desenvolvimento do enfisema pulmonar induzido
por elastase em camundongos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Fernanda Degobbi
Tenorio Quirino dos Santos Lopes

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Robertoni, Fabíola Santos Zambon

Estudo das fibras constituintes da matriz extracelular e da expressão de metaloproteases durante o desenvolvimento do enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos / Fabíola Santos Zambon Robertoni. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Modelos animais 2.Doença pulmonar obstrutiva crônica 3.Enfisema pulmonar 4.Matriz extracelular 5.Colágeno 6.Elastina 7.Metaloproteinases da matriz 8.Camundongos

USP/FM/DBD-004/15

DEDICATÓRIA

*Ao Daniel, pelo amor e compreensão, por
valorizar tudo o que sou, por me ajudar a
ser uma pessoa melhor, e por que eu sei que
estará sempre ao meu lado.*

*Aos meus sobrinhos Pedro, Lucas e
Pedrinho, por alegrarem minha vida com a
suas, e por me ensinarem que são as
pequenas coisas que realmente importam.*

*Aos pacientes, pelos quais iniciei essa
jornada e sem os quais todo meu esforço não
teria sentido.*

AGRADECIMENTOS

*“I would rather walk with a friend in
the dark than walk alone in the light”.*

Helen Keller

Ao longo desses últimos anos, muitos cruzaram meu caminho e contribuíram de alguma forma para que esse trabalho se concretizasse. Agradeço igualmente aos momentos alegres, porque tornaram a vida mais leve, e aos momentos de dificuldade, porque, como trampolins, me impulsionaram a seguir adiante e não me acomodar.

À minha orientadora, Dra. Fernanda Lopes, por ter me acolhido de forma generosa no seu grupo de pesquisa e permitir que eu fizesse parte da família LIM-20. Agradeço por ter tido paciência e me ajudado a perseverar nos momentos de dificuldade e, acima de tudo, por confiar em mim para a execução deste trabalho.

À Clarice Olivo, por ter me apresentado à Fernanda e ao mundo da pesquisa experimental, tornado, assim, toda essa conquista possível. Agradeço pela sua contribuição neste estudo e por poder contar com sua amizade.

Ao Prof. Chin Jia Lin, por ter disponibilizado seu laboratório para parte desse trabalho e contribuído no desenho dos protocolos de biologia molecular. Agradeço a paciência, toda a atenção e a generosidade em compartilhar seus conhecimentos.

À Dra. Walcy Teodoro por ter permitido a minha entrada no LIM-17 e ter contribuído nos ensaios de imunofluorescência. Agradeço todo o carinho, a atenção e o tempo que disponibilizou para a realização desse trabalho.

À banca de qualificação por suas análises e sugestões que contribuíram muito para a forma final dessa dissertação: Profa. Iolanda Tibério, Dra. Elnara Negri e Dra. Fernanda Arantes.

À Dra. Ana Paula Velosa por ter contribuído imensamente nas padronizações dos ensaios de imunofluorescência e pela contribuição na elaboração das imagens do artigo científico.

À Natalia Gonçalves, por me ajudar a executar da melhor forma possível as técnicas de biologia molecular e sanar muitas dúvidas.

Aos amigos do laboratório: Juliana, Rubia, Petra, Camila, Davi, Eleonardo, Rodrigo, Babi, Thayse, Fernanda, Beatriz, Adenir, Edna, Rosana, por terem feito parte da minha vida ao longo desses anos, quer auxiliando neste trabalho, quer me apoiando, me fazendo rir e tornando o trabalho e a vida mais agradáveis.

À Claudia Fló, que contribuiu na gênese da idéia do projeto executado neste mestrado.

À Angela e à Maria Cristina do Laboratório de Imunohistoquímica da FMUSP, pela realização das reações de imuno-histoquímica deste trabalho.

Às secretárias do Programa de Fisiopatologia Experimental, especialmente à Tânia por ter auxiliado tanto nos processos burocráticos deste mestrado.

Ao Davi, que tanto nos auxilia para que o laboratório funcione adequadamente.

Aos meus pais, Fábio e Liz, por terem me ensinado os valores que moldaram meu caráter, por terem se empenhado e, muitas vezes, se sacrificado para que eu tivesse uma educação de qualidade, permitindo que eu chegasse até aqui.

Ao meu marido Daniel, por ter tido paciência nos meus momentos de estresse e nas minhas ausências e por ter sempre torcido por mim.

Aos meus irmãos Lucas e Fabrício por acreditarem na minha capacidade e sempre desejarem meu sucesso.

À Alessandra pela contribuição na revisão do resumo deste texto.

Às minhas grandes amigas: Luciana Fadel, Mariana Bonaldo, Fabíola Murta, Mariana Cancelli, Margarida Yãnez, e a todos os “Pontas Firms” por sempre torcerem por mim e tornarem a vida uma grande festa!

A todos, muito obrigada!

EPÍGRAFE

*“I am enough of an artist to draw
freely upon my imagination.
Imagination is more important than
knowledge. Knowledge is limited.
Imagination encircles the world”.*

Albert Einstein

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP:

Bolsa de Mestrado: Processo 2012/02957-8

Projeto de Pesquisa Regular: Processo 2011/08584-6

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Quadros e Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Sobre a DPOC	2
1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC	3
1.3 Epidemiologia da DPOC	3
1.4 Patogênese da DPOC	5
1.4.1 Desequilíbrio do sistema Protease-Antiprotease	6
1.4.2 Inflamação	11
1.4.3 Estresse Oxidativo	12
1.4.4 Apoptose	13
1.5 Matriz Extracelular	15
1.5.1 Remodelamento do Parênquima na DPOC	16
1.6 Modelos experimentais de enfisema pulmonar	17
1.6.1 O remodelamento pulmonar em modelos experimentais de enfisema	20
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos específicos	26

4. MÉTODOS	28
4.1 Animais	28
4.2 Indução do Enfisema	28
4.3 Grupos Experimentais	29
4.4 Retirada e Fixação dos Pulmões para Histologia	32
4.5 Técnicas de Imuno-histoquímica	32
4.6 Avaliação Morfométrica	35
4.7 Quantificação dos Colágenos tipo I e III, da Elastina e da Fibrilina no Parênquima Pulmonar	37
4.8 Estudo da expressão gênica para Metaloproteases	38
4.8.1 Criopreservação de tecidos e Extração de RNA	38
4.8.2 Análise da Qualidade do RNA	39
4.8.3 Quantificação do RNA total	40
4.8.4 Transcrição reversa	41
4.8.5 RT-PCR em tempo real	42
4.9 Análise estatística	44
5. RESULTADOS	47
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÕES	70
8. ANEXOS	72
9. REFERÊNCIAS	74

Lista de Abreviaturas e Siglas

α1-AT	Alfa-1 Antitripsina
C57BL/6	Camundongo de linhagem isogênica (inbred) modelo para imunologia
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEP-FMUSP	Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Col I	Colágeno Tipo I
Col III	Colágeno Tipo III
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DEPC	Dietilpirocarbonato
DP	Desvio Padrão
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECM	Extracellular Matrix
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAGs	Glicosaminoglicanos
HE	Coloração Hematoxilina-eosina
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
IHME	Institute for Health Metrics and Evaluation
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LBA	Lavado Broncoalveolar
LIM	Laboratório de Investigação Médica da FMUSP
L_m	Intercepto Linear Médio

LTB₄	Leucotrieno B ₄
LT CD8+	Linfócito T CD8+
MEC	Matriz Extracelular
mEPHX1	Epóxido Hidrolase Microsomal
MMP	Metaloprotease de Matriz
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NE	Elastase Neutrófila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato-salino
PPE	Elastase Pancreática de Porco
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação de Polimerização em Cadeia, do inglês “Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction”
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TGF-β1	Fator de Crescimento Tumoral Beta 1
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UV/Vis	Ultravioleta Visível
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Lista de Símbolos

cmH₂O	Centímetros de água
C	Concentração
g	Grama
°C	Grau Celsius
=	Igual
<	Menor
μl	Micro litro
μm	Micrometro
mg	Miligramma
mg/ml	Miligramma por mililitro
mg/kg	Miligramma por quilogramma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
ng	Nanogramma
ng/μl	Nanogramma por microlitro
%	Percentual
nM	Nanomolar
kg	Quilogramma
UI	Unidades Internacionais
V	Volume

Lista de Figuras

Figura 1:	Frequência de tabagismo na população brasileira em 2007, segundo a OMS.....	4
Figura 2:	Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC.....	14
Figura 3:	Esquema do protocolo de pesquisa	31
Figura 4:	Modelo do retículo de Weibel utilizado nas análises morfométricas	36
Figura 5:	Exemplo de uma fotografia de eletroforese em gel de agarose	40
Figura 6:	Valores do Intercepto Linear Médio – L_m no parênquima pulmonar dos grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo	47
Figura 7:	Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos dos grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo	48
Figura 8:	Proporção de Colágeno do Tipo I no parênquima pulmonar dos grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo	49
Figura 9:	Proporção de Colágeno do Tipo III no parênquima pulmonar dos grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo	51
Figura 10:	Proporção de Elastina no Parênquima Pulmonar dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo. Houve diferença significativa no grupo ELA-3d ($^{ss}p=0,014$) e no grupo ELA-21d ($^{***}p=0,012$) com relação aos seus respectivos controles. Os dados estão expressos em Média $\pm$ DP	52
Figura 11:	Fotomicrografias de colágeno tipo I no parênquima pulmonar	53
Figura 12:	Fotomicrografias de elastina no parênquima pulmonar	53
Figura 13:	Fotomicrografias de colágeno tipo III no parênquima pulmonar	54

Figura 14:	Proporção de Fibrilina no Parênquima Pulmonar dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo	55
Figura 15:	Expressão Gênica para MMP-8 dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo, expressa por Delta Ct	56
Figura 16:	Expressão Gênica para MMP-12 dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo, expressa por Delta Ct	57
Figura 17:	Expressão Gênica para MMP-13 dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo, expressa por Delta Ct	58
Figura 18:	Expressão Gênica para MMP-1b dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo, expressa por Delta Ct	59
Figura 19:	Curvas padrão utilizadas para comparar as eficiências dos Ensaios realizados em Taqman e os ensaios realizados em SYBR Green	60

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1:	Principais MMPs envolvidas no enfisema pulmonar.....	10
Quadro 2:	Anticorpos utilizados nos estudos de imunofluorescência.	34
Quadro 3:	Anticorpos utilizados nos estudos de imuno-histoquímica.....	35
Quadro 4:	Resumo dos resultados obtidos em todos os tempos do protocolo.....	61
Tabela 1:	Tabela de volumes dos reagentes para reação de transcrição reversa, adaptada do manual do kit <i>High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix</i> ..	41

RESUMO

Robertoni FSZ. *Estudo das fibras constituintes da matriz extracelular e da expressão de metaloproteases durante o desenvolvimento do enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma das principais causas de morbidade crônica e mortalidade em todo o mundo e tem como principal manifestação o enfisema pulmonar, caracterizado pelo contínuo e progressivo remodelamento dos componentes da matriz extracelular (MEC). De acordo com estudos experimentais e clínicos esse remodelamento pode ser atribuído à ação proteolítica das metaloproteases de matriz (MMPs), especialmente da MMP-12, sobre os componentes da MEC, sendo a elastina considerada, até recentemente, a principal fibra alvo da proteólise. Dessa forma, só recentemente tem sido esclarecida a importância de outros componentes da MEC e outras MMPs, como as collagenases, no remodelamento da MEC. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a progressão do remodelamento das fibras no parênquima pulmonar e a expressão gênica das MMPs no início do desenvolvimento do enfisema. Para isso camundongos C57BL/6 receberam instilação intranasal de elastase pancreática suína (PPE 0,667 UI / Grupos ELA: n=40) ou o mesmo tratamento com solução salina (NaCl 0,9% / Grupos controle SAL: n=40). Os animais foram anestesiados, eutanasiados e separados em sub-grupos iguais (n=8) de acordo com o tempo após a instilação de PPE (1, 3, 6 horas, 3 e 21 dias) para remoção dos seus pulmões. Foram medidos o intercepto linear médio (L_m) e as proporções do volume de colágeno tipo I e tipo III, elastina e fibrilina. A expressão gênica para metaloproteinases (MMP-1a, MMP-1b, MMP-8, MMP-12 e MMP-13) no parênquima pulmonar foi avaliada por RT-PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que o L_m aumentou desde 3 horas após a instilação de PPE, atingindo os maiores aumentos no 3º e 21º dias, sugerindo uma progressão no alargamento alveolar. Em comparação com o grupo SAL, os grupos ELA apresentaram uma diminuição no colágeno tipo I (no 3º dia) e colágeno tipo III (a partir de 6 horas até 3 dias) em tempos posteriores ao aumento da expressão gênica para MMP-8 (a partir de 3 até 6 horas) e - 13 (a partir de 1 até 6 horas). Após 21 dias, o colágeno tipo III apresentou aumento e o colágeno tipo I retornou a valores semelhantes aos do seu respectivo grupo controle. A expressão gênica para MMP-12

aumentou nos grupos ELA em tempos anteriores (3 e 6 horas) aos que constatamos a redução na proporção de elastina no pulmão (3º dia), reforçando a importância já estabelecida da MMP-12 na quebra deste componente da MEC. A proporção de volume de elastina aumentou no grupo ELA em relação ao respectivo grupo SAL no 21º dia. Não houve aumento na expressão gênica da MMP-1b em nenhum momento e a MMP-1a não teve expressão mensurável em nenhum dos grupos. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais na avaliação da fibrilina. Nossos resultados serão úteis para melhor elucidar as alterações dinâmicas nos componentes da MEC e a importância, não só da metaloelastase, mas também das collagenases em estágios iniciais do enfisema, fornecendo novas ferramentas para futuros estudos sobre possíveis alvos terapêuticos.

Descritores: Modelos Animais; Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; Enfisema Pulmonar; Matriz Extracelular; Colágeno; Elastina; Metaloproteinases da Matriz; Camundongos.

ABSTRACT

Robertoni FSZ. *Study of the extracellular matrix constituent fibers and of the metalloproteases gene expression during development of elastase-induced pulmonary emphysema in mice* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major cause of chronic morbidity and mortality worldwide and has as the major manifestation pulmonary emphysema in which the components of the extracellular matrix (ECM) are in a continuous process of remodeling. According to experimental and clinical studies that remodeling can be attributed to proteolytic action of matrix metalloproteinases (MMPs), particularly MMP-12, on the ECM components, with elastin being considered until recently, the primary target fiber of proteolysis. Therefore, only recently has been clarified the importance of other components of the ECM and other MMPs such as collagenases on ECM remodeling. Thus, the objective of this study was to analyze the progression of lung parenchymal fibers remodeling and the gene expression of MMPs in the early development of emphysema. For this C57BL/6 mice were given intranasal instillation of porcine pancreatic elastase (PPE 0,667 IU / ELA groups: n=40) or the same treatment with saline (0.9% NaCl / SAL Control groups: n=40). The animals were anesthetized and euthanized divided into equal sub-groups (n=8) according to time after PPE instillation (1, 3, 6 hours, 3 and 21 days) to remove their lungs. The mean linear intercept (L_m) and the volume proportions of type I and type III collagen, elastin and fibrillin were measured. Gene expression of metalloproteinases (MMP-1a, 1b-MMP, MMP-8, MMP-12 and MMP-13) in the lung parenchyma was evaluated by Real Time RT-PCR. The results demonstrated that the L_m has increased from 3 hours after PPE instillation, with the highest increases reached at 3rd and 21th day, suggesting a progression in the alveolar enlargement. Compared to SAL group, ELA group showed a decrease in type I collagen (3rd day) and collagen type III (from 6 hours to 3 days) on later times to the increase in MMP-8 gene expression (from 3 to 6 hours) and - 13 (from 1 to 6 hours). After 21 days, type III collagen showed an increase and collagen type I returned to values similar to those of their respective control group. Gene expression for MMP-12 increased on PPE groups in earlier times (3 and 6 hours) at which we detected reduction in elastin proportion in the lung (3rd day), reinforcing the importance already

established of MMP-12 in the breakage of this ECM component. The elastin volume proportion increased in PPE group compared to respective SAL group at 21st day. There was no increase in MMP-1b gene expression at any time and MMP-1a shows no measurable expression in either group. There were no differences between the experimental groups in the evaluation of fibrillin. Our results will be useful to better elucidate the dynamic changes in ECM components and the importance not only of metalloelastase but also of collagenases in the early stages of emphysema, providing new tools for future studies of potential therapeutic targets.

Descriptors: Models Animal; Pulmonary Disease, Chronic Obstructive; Pulmonary Emphysema; Extracellular Matrix; Collagen; Elastin; Matrix Metalloproteinases; Mice.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sobre a DPOC

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é a quarta principal causa de mortalidade no mundo e uma importante e crescente causa de morbidade crônica, gerando altos custos para a saúde pública, significativa incapacidade e redução da qualidade de vida para seus portadores ^{1; 2}. É uma doença progressiva e incurável, porém prevenível e tratável, sendo caracterizada por acometimento pulmonar com efeitos sistêmicos importantes, que podem contribuir de forma variável para sua gravidade e levar à morte prematura. Os sintomas característicos da DPOC são dispneia crônica e progressiva, tosse crônica e hipersecreção de muco ¹.

O componente pulmonar da DPOC é caracterizado por limitação crônica, progressiva, não totalmente reversível ao fluxo aéreo e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos ¹. A limitação ao fluxo aéreo é causada por comprometimento das pequenas vias aéreas (bronquiolite obstrutiva) e pela destruição do parênquima pulmonar (enfisema). Além disso, a DPOC tem efeitos extrapulmonares importantes que levam a comorbidades como perda de peso, anormalidades nutricionais e disfunção muscular esquelética ¹. No entanto, nem todos os portadores de DPOC seguem o mesmo curso na progressão da doença, apresentando alterações pulmonares, exacerbações e comorbidades de graus variados, que contribuem para a gravidade da doença de forma individual ^{1; 3}.

Ainda não há cura para a DPOC e não existem terapias que reduzam efetivamente sua progressão. Isso porque a inflamação característica da doença parece resistente a corticosteróides, sendo a farmacoterapia utilizada somente para minimizar os sintomas e complicações ^{1; 4}. Quando a doença é devidamente diagnosticada, se torna possível realizar um acompanhamento com orientações e tratamento, o que pode retardar o progresso da doença e melhorar o prognóstico, a qualidade de vida e capacidade de realização de atividades de vida diária ¹.

1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o tabagismo é a principal causa de morte evitável em todo o mundo, e ainda é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC^{1; 5}. A OMS estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas (entre as quais 200 milhões de mulheres), sejam fumantes⁶. Em vários países, a DPOC também está relacionada à inalação de poluentes decorrentes da queima de combustíveis fósseis e a exposições inalatórias ocupacionais a poeiras e gases tóxicos. Entretanto, não são todos os tabagistas que desenvolvem DPOC clinicamente significativa, o que nos sugere que há outros fatores intrínsecos ao indivíduo envolvidos na sua patogênese¹, como fatores genéticos, que podem aumentar a susceptibilidade individual para os efeitos adversos da fumaça do cigarro, ou alterar os processos normais de reparação pulmonar⁷.

A DPOC é uma doença poligênica, sendo um exemplo de interação gene-ambiente. Um dos fatores de risco genético é a deficiência hereditária de alfa-1 antitripsina ($\alpha 1$ -AT), de caráter recessivo. Já foram identificadas algumas regiões do genoma que contém genes provavelmente relacionados à susceptibilidade para DPOC. Também foi encontrada associação genética com o fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- $\beta 1$), a epóxido hidrolase microsossomal (mEPHX1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)¹.

1.3 Epidemiologia da DPOC

Os dados disponíveis em estudos atuais sugerem que a prevalência de DPOC em adultos com idade ≥ 40 anos é de ~9-10%². Segundo a OMS⁸, 65 milhões de pessoas apresentam diagnóstico de DPOC moderada a grave em todo o mundo. Nos Estados Unidos, a DPOC é a terceira principal causa de mortes, sendo que 12 milhões de pessoas têm a doença, e cerca de 12 milhões ainda permanecem sem diagnóstico⁹. De

acordo com o IHME (Institute for Health Metrics and Evaluation), em 2010, o número de mortes por DPOC no mundo todo foi de aproximadamente 2,9 milhões de pessoas, correspondendo a cerca de 5,5% da população mundial ¹⁰.

Uma revisão sistemática seguida de meta-análise em estudos publicados de 1985 até 2012 pela América Latina e Caribe concluiu que a DPOC tem um alto impacto nesses países, com uma prevalência de 13,4%, e acomete principalmente homens e idosos. Verificou-se ainda que a maioria desses pacientes foi subtratada de acordo com as diretrizes internacionais, apresentando altas taxas de exacerbação e de hospitalização, o que gerou altos custos econômicos ¹¹.

No Brasil, a última estimativa de prevalência do tabagismo, realizada em 2007, mostra que o tabagismo atinge 16,4% na população de 18 a 100 anos, sendo 20,9% dos homens e 12,6% das mulheres ¹² (Figura 1). Analisando dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), Azambuja et al. ¹³, calculou que, em 2011, o total de indivíduos com DPOC provenientes do tabagismo no Brasil seria de 4.320.000. O estudo PLATINO mostrou uma prevalência de DPOC em 15,8% da população da cidade de São Paulo, acometendo 18% dos homens e 14% das mulheres ¹⁴.

Figura 1: Frequência de tabagismo na população brasileira em 2007, segundo a OMS. **Fonte:** Azambuja et al., 2013 ¹³.

A DPOC nos últimos anos vem ocupando da quarta a sétima posição entre as principais causas de morte no Brasil. Em 2003, essa doença foi a quinta maior causa de internações de indivíduos maiores de 40 anos no sistema público de saúde do Brasil, com gasto aproximado de 72 milhões de reais ³. Nos próximos 10 anos, acredita-se que essas mortes vão aumentar em mais de 30% e a DPOC se tornará, em 2020, a terceira principal causa de morte em todo o mundo a menos que sejam tomadas medidas urgentes para reduzir os fatores de risco, especialmente o tabagismo ^{1; 8}. Uma nova projeção aponta a DPOC com a quarta causa de mortes no mundo em 2030 ¹⁵.

1.4 Patogênese da DPOC

As alterações histopatológicas características da DPOC, como inflamação crônica e alterações estruturais, são encontradas nas vias aéreas proximais, vias aéreas periféricas, parênquima e vasculatura pulmonar ¹. A resposta inflamatória à fumaça do cigarro e outras partículas nocivas parece estar aumentada em quem desenvolve a DPOC, e não melhora mesmo após o abandono do hábito de fumar ¹⁶.

A inflamação crônica no pulmão é aumentada pelo estresse oxidativo e pelo excesso de proteinases no pulmão, e leva a diversas alterações estruturais ¹. Ao longo do tempo, há destruição do parênquima pulmonar, com a perda das ligações entre os alvéolos e pequenas vias aéreas e a destruição das paredes alveolares, o que leva ao alargamento dos espaços aéreos e estreitamento das pequenas vias aéreas, reduzindo assim o recolhimento elástico pulmonar ^{1; 7}. As alterações patológicas da DPOC também se desenvolvem nas vias aéreas e incluem a metaplasia mucosa e a hipersecreção de muco ⁷. Essas alterações são decorrentes do processo de lesão e reparação constantes do tecido ¹ e levam à obstrução irreversível ao fluxo aéreo ⁷. Essas alterações justificam as características da doença, tais como hipersecreção mucosa, disfunção ciliar, limitação do fluxo aéreo, hiperinflação pulmonar, anomalias nas trocas gasosas, hipertensão pulmonar e cor pulmonale, que se desenvolvem geralmente nessa ordem durante o curso da doença ¹⁷.

Entre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão do enfisema, incluem-se a hipótese protease-antiprotease, inflamação, estresse oxidativo¹⁸. Cada um desses mecanismos contribui de forma variável para o desenvolvimento da DPOC, o que pode explicar as diferentes formas de apresentação e gravidade da doença¹⁹.

1.4.1 Desequilíbrio do sistema Protease-Antiprotease

A hipótese mais aceita para explicar a destruição tecidual no enfisema é o desequilíbrio entre a atividade de proteases e antiproteases²⁰, que foi baseada na observação dos resultados de dois estudos da década de 60, um clínico e um experimental. No estudo clínico, Laurell e Eriksson²¹ observaram que indivíduos com deficiência genética do inibidor de protease α 1-AT apresentavam maior risco de desenvolver enfisema. No estudo experimental, conduzido pouco tempo depois, os autores mostraram que a instilação de papaína em pulmões de ratos resultou no alargamento progressivo dos espaços aéreos²².

O mecanismo proposto nessa hipótese é de que a inalação da fumaça de cigarro (ou de outras partículas nocivas) leva ao recrutamento de células inflamatórias para dentro dos pulmões. Essas células inflamatórias ativadas liberam diversas proteases que excedem a quantidade dos inibidores de proteases (antiproteases) que são protetores do pulmão⁷. Já foi demonstrado que em fumantes que desenvolvem a DPOC, a produção de antiproteases é insuficiente para neutralizar as proteases e evitar a lesão pulmonar¹⁶. A ação dessas proteases leva então à destruição das fibras constituintes do parênquima pulmonar, o que acarreta perda das paredes alveolares e alargamento dos espaços aéreos, com consequente redução de elasticidade tecidual^{18; 23}. Diversas proteases estão aumentadas na DPOC, incluindo as serino proteases (elastase neutrofílica - NE²⁴, catepsina G e proteinase 3²⁵), as cisteíno proteinases (catepsinas B, K²⁵, L²⁵ e S²⁵), e as metaloproteases de matriz - MMPs (MMP-12¹, MMP-8²⁶, MMP-1²⁷, MMP-13²⁸ e MMP-9²⁷).

As MMPs têm função de regulação da homeostase e da imunidade, e de remodelamento dos tecidos, sendo capazes de degradar todos os componentes da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal. Estudos recentes revelaram que as MMPs regulam a liberação ou ativação de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, peptídeos antibióticos e outras moléculas bioativas, participando, assim, em processos como imunidade inata e adaptativa, inflamação, angiogênese, remodelamento ósseo, e crescimento de neurites ²⁹. Diversos estudos do enfisema em animais e humanos têm mostrado várias MMPs desempenhando um papel importante no ataque de componentes proteicos da MEC no parênquima pulmonar ^{30; 31}. Estudos realizados por Janoff et al. ³² sugerem que até 50% da atividade elastolítica no lavado broncoalveolar (LBA) de fumantes pode ser atribuída às MMPs.

As MMPs são consideradas proteases multifuncionais ²⁹, tendo ação em diversos substratos e sítios de clivagem, dados que podem ser encontrados no banco de dados online MEROPS ³³. As MMPs -1, -8 e -13 são consideradas collagenases e são responsáveis principalmente pela clivagem de colágenos fibrilares, tais como os tipos I, II e III ³⁴, já as MMPs -9 e -12 são consideradas elastases e clivam principalmente as fibras elásticas ³⁵. Há evidências crescentes de que macrófagos e neutrófilos de pacientes enfisematosos produzam MMPs, com atividades tanto collagenolítica quanto elastolítica ²⁷, gerando peptídeos quimiotáticos que promovem recrutamento de mais macrófagos e neutrófilos para o tecido ²⁵. Resultados prévios enfocaram a perda de elastina das paredes alveolares como o evento principal na patogênese do enfisema ^{36; 37}, sendo esta considerada o principal alvo das MMPs, com particular atenção dispensada ao papel da MMP-9 e da MMP-12 ^{20; 27; 38; 39; 40}. No entanto, alguns pesquisadores sugerem que a hipótese protease-antiprotease é muito limitada ao focar somente na degradação da elastina ⁴¹, sendo que só recentemente tem sido dada a devida importância ao papel do colágeno da matriz e de muitas collagenases no desenvolvimento do enfisema ^{31; 27; 42}.

Nos últimos 20 anos, foi demonstrado que as MMPs, incluindo MMP-1, -2, -7, -9 e -12 podem degradar uma variedade de componentes de matriz, incluindo colágeno e elastina, e, então, a hipótese de proteases-antiproteases passou a incluir as MMPs ³¹. A importância das MMPs no enfisema recebeu grande suporte a partir de um modelo experimental de enfisema pulmonar, onde camundongos nocautes para MMP-12 não

desenvolveram enfisema e não apresentaram aumento do número de macrófagos após a exposição de fumaça de cigarro ⁴³. A ideia foi reforçada por estudos que demonstraram a prevenção ou melhora do enfisema em animais por inibidores de MMPs ³¹. O tratamento de cobaias com um inibidor de MMP-9 / MMP-12 seguido de 6 meses de exposição à fumaça de cigarro, protegeu os animais do desenvolvimento do enfisema, com importante diminuição dos neutrófilos e macrófagos do LBA ⁴⁰. Estas observações indicam que, em modelos animais, a MMP-12 tem um grande papel no desenvolvimento do enfisema, podendo levar à liberação de quimiotáticos para neutrófilos, ao ataque de proteínas da matriz e à liberação de fragmentos da MEC, atraindo assim macrófagos ³¹. Entretanto, apesar de a MMP-12 estar presente em seres humanos, seu papel parece não ser tão importante quanto o da MMP-9 ²⁵. Imai et al. ⁴⁴ não encontraram supra-regulação da MMP-12 nos pulmões de pacientes com enfisema. LaPan et al. ⁴⁵ foram capazes de encontrar MMP-12 no escarro induzido de pacientes com DPOC, mas não identificaram diferenças com relação ao grupo controle. No entanto, Demedts et al. ⁴⁶ relataram um aumento dos níveis de MMP-12 no escarro de indivíduos com DPOC comparado a fumantes saudáveis, ex-fumantes e não fumantes. Utilizando microarrays para analisar a expressão gênica de macrófagos alveolares, Woodruff et al. ⁴⁷ encontraram um aumento de nove vezes na expressão para MMP-12 em fumantes, comparado a não fumantes e asmáticos. Num estudo em pacientes com DPOC, observou-se aumento no número de macrófagos alveolares que expressavam a MMP-12 no LBA e o nível de expressão foi mais elevado na DPOC do que nos controles ⁴⁸. Essas diferenças entre as observações da MMP-12 em humanos e modelos animais se dá pela diferente expressão gênica (MMP12 é muito mais expressa em camundongos que em humanos) e pelas diferenças sutis na função desta MMP nas diferentes espécies. A MMP-12 murina tem função pró-inflamatória, através da ativação de um quimiotático para neutrófilos, e a MMP-12 humana, pelo contrário, inibe o recrutamento neutrofílico pela inativação de diversas quimiocinas ³¹.

Em 1992, D'Armiento et al. ⁴⁹ desenvolveram um modelo de camundongos transgênicos com superexpressão de MMP-1 humana que apresentavam enfisema logo após o nascimento. A partir desse estudo, tornou-se evidente que o enfisema não tem sua origem apenas na degradação da elastina por elastase, e que outros componentes da MEC têm grande importância no desenvolvimento da DPOC. Mais recentemente, foi

demonstrado que em pacientes enfisematosos, a MMP-1 (colagenase intersticial) e a MMP-9 (gelatinase B) estão aumentadas no LBA. A MMP-9 também apresenta atividade aumentada no parênquima pulmonar desses pacientes, levando a uma maior atividade elastolítica no tecido ¹⁶. Em cobaias expostas à fumaça do cigarro, foi observado um aumento da atividade das MMPs -1 e -9, e diminuição da concentração de colágeno ⁵⁰. Em outro estudo, os macrófagos alveolares de pacientes com DPOC expressaram mais MMP-9 do que os de indivíduos normais ⁵¹. Camundongos nocautes para MMP-9 não estão protegidos contra o enfisema induzido por fumaça de cigarro, no entanto, estão protegidos da fibrose das pequenas vias aéreas ⁵².

Finlay et al. ²⁷ mostraram em LBA de pacientes enfisematosos que os macrófagos aumentaram a produção de colagenases. Segura-valdez et al. ²⁶ mostraram um aumento da expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9 em tecido pulmonar de pacientes com DPOC em comparação com os controles. Em camundongos transgênicos que expressavam colagenase MMP-1 humana foi demonstrado o desenvolvimento de enfisema ⁴⁹ evidenciado pela degradação de colágeno tipo III ⁵³. Imai et al. ⁴⁴ também encontraram um aumento de RNA mensageiro (mRNA), proteínas e atividade colagenolítica da MMP-1 no parênquima pulmonar de pacientes enfisematosos, sendo que essa MMP foi localizada em pneumócitos tipo II através de imuno-histoquímica. Em estudos recentes, foram encontrados significativamente mais macrófagos alveolares e pneumócitos tipo II expressando MMP-1 em pulmões de pacientes com enfisema do que em indivíduos não fumantes ⁵⁴, além de uma maior atividade da colagenase em fumantes com enfisema do que em fumantes que não apresentavam a doença ⁵⁵.

Em camundongos, a MMP-1 murina parece ter funções diferentes da MMP-1 humana, sendo a MMP-13 o equivalente mais próximo da protease humana. Poucos estudos foram conduzidos a fim de avaliar o papel da MMP-13 na DPOC. Em um modelo de exposição à fumaça do cigarro por 6 meses, foi observado um aumento da MMP-13 em camundongos ⁵⁶. Lee et al. ²⁸, utilizando a análise de proteoma do tecido pulmonar, encontraram aumento da expressão para MMP-13 nos pulmões de pacientes com DPOC. No entanto, não foram encontradas diferenças nas expressões gênicas para MMP-13 no parênquima pulmonar humano nos diferentes estágios da DPOC ⁵⁷.

Com relação à MMP-8, encontrada principalmente em neutrófilos, também há poucos dados disponíveis na literatura a respeito de sua função na DPOC. Foi identificado o aumento da MMP-8 no escarro induzido de pacientes com DPOC⁵⁸. Essa MMP apresentou níveis elevados em pacientes com exacerbação da DPOC, quando comparados a pacientes com DPOC estável e controles, e está relacionada ao recrutamento neutrofílico nas vias aéreas⁵⁹. Betsuyaku et al.⁶⁰ encontraram níveis maiores de MMP-8 e -9 em fumantes com DPOC do que em fumantes sem a doença. O Quadro 1 apresenta os dados referentes às principais MMPs envolvidas no enfisema pulmonar.

Quadro 1: Principais MMPs envolvidas no enfisema pulmonar.

MMP	Outros nomes	Célula Secretora	Principais Substratos
MMP-1	Colagenase 1 Colagenase Intersticial Metalopeptidase de matriz 1 Colagenase de vertebrados	Fibroblastos Macrófagos Neutrófilos Pneumócito Tipo II Células Endoteliais	Colágenos tipos I, II, III, VII, VIII, X; MMP-2; MMP-9.
MMP-8	Colagenase Neutrofílica Metalopeptidase de matriz 8 Colagenase 2	Neutrófilos	Colágenos tipos I, II, III, V, VII, VIII, X; gelatina; elastina.
MMP-9	Gelatinase B Metalopeptidase de matriz 9 Gelatinase de 92 kDa Gelatinase dos macrófagos Gelatinase de neutrófilos Colagenase tipo IV Colagenase tipo V	Neutrófilos Fibroblastos Células Endoteliais Monócitos Macrófagos alveolares Leucócitos Trofoblastos	Colágenos tipos IV, V, VII; fibronectina, elastina.
MMP-12	Metaloelastase Macrofágica Metalopeptidase de matriz 12 Metaloelastase	Macrófagos	Elastina; gelatina; laminina; fibronectina.
MMP-13	Colagenase 3 Metalopeptidase de matriz-13 AgMMP3	Fibroblastos	Colágenos tipos I, II, III, IV; MMP-9; fibrilina.

Fonte: Adaptado de Skiles et al., 2001⁶¹ e MEROPS – the Peptidase Database³³.

1.4.2 Inflamação

Neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (sobretudo CD8+) são as principais células inflamatórias envolvidas no padrão específico de inflamação da DPOC. A fumaça do cigarro induz as células epiteliais a produzir citocinas que estimulam os neutrófilos e macrófagos, mas também age diretamente na ativação das mesmas. Essas células liberam mediadores inflamatórios e interagem com células das vias aéreas e parênquima pulmonar ¹.

Em estudos feitos por Lacoste et al. ⁶² e Keatings et al. ⁶³ foi observado aumento de neutrófilos ativados em amostras de escarro e no LBA de pacientes com DPOC. Estas células inflamatórias são responsáveis pela secreção de proteases, incluindo elastase neutrofílica, catepsina G, e proteinase-3, envolvidas no aumento da produção de muco pelo epitélio das vias aéreas e na destruição das paredes alveolares. Fatores quimiotáticos incluindo interleucina-8 (IL-8) e leucotrieno B₄ (LTB₄) promovem a migração neutrofílica da circulação sistêmica para o trato respiratório. O aumento no número de neutrófilos nos brônquios e amostras de escarro está relacionado à gravidade da doença ¹⁶.

É observado também um aumento do número de macrófagos em regiões de lesão do parênquima alveolar de enfisematosos ^{16; 64}, havendo também uma correlação entre o número de destas células e a gravidade da doença ⁶⁵. Quando ativados, os macrófagos liberam mediadores como o TNF- α , a IL-8, leucotrienos como o LTB₄, prostaglandinas, metaloproteases de matriz (MMPs), espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas e quimiocinas ^{16; 64}. Os macrófagos alveolares de pacientes com DPOC secretam mais proteínas inflamatórias e têm maior atividade elastolítica quando expostos a fumaça do cigarro ¹⁶. O TNF- α e IL-1 β aumentam a expressão de MMP-9 por macrófagos humanos, sem aumentar a expressão do seu inibidor, o inibidor tecidual de metaloproteases (TIMP-1) ⁶⁶. O TNF- α é responsável por cerca de 70% do enfisema induzido por fumaça de cigarro em camundongos ⁵⁶ e sua liberação nesses animais depende da MMP-12, tendo sido suprimida em camundongos nocaute para essa protease ⁶⁷.

Linfócitos T CD8 + (LT CD8+) parecem ter um papel importante no desenvolvimento e progressão da DPOC, já que estão aumentados em número total no parênquima pulmonar e nas vias aéreas centrais e periféricas de pacientes enfisematosos ⁶⁸. Os LT CD8+ podem causar lesão tecidual na DPOC diretamente, por mediar a morte celular ¹², ou através da secreção de mediadores pró-inflamatórios, como a granzima e as perforinas ⁶⁸. As células epiteliais são, na DPOC, importantes fontes de mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-8, sendo ativadas pelo fumo do tabaco. Nas pequenas vias aéreas são fonte de TGF- β , o que induz à fibrose local ¹⁶. O papel dos eosinófilos na DPOC ainda não está muito bem esclarecido. Proteínas básicas de eosinófilos estão presentes no escarro de pacientes com DPOC, sugerindo que os eosinófilos degranularam devido a altos níveis de elastase neutrofílica ¹². Têm sido verificados altos níveis de eosinófilos no escarro, no LBA e nas paredes das vias aéreas de pacientes com DPOC ⁶⁴.

1.4.3 Estresse Oxidativo

Considera-se que um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes desempenhe um papel na patogênese da DPOC. A fase gasosa da fumaça do cigarro é uma fonte extremamente concentrada de EROs e espécies reativas de nitrogênio como o ânion superóxido, óxidos nítricos e peroxinitritos, e a resposta inflamatória à fumaça aumenta potencialmente o estresse oxidativo ^{69; 70; 71}. Os oxidantes e radicais livres da fumaça de cigarro podem danificar as células epiteliais das vias aéreas, e afetar a ação de antioxidantes ⁷². Esses oxidantes também podem danificar diretamente os componentes da MEC, e interferir com a síntese e reparação da elastina ⁷³. Há evidências de aumento do estresse oxidativo e produção de EROs, com redução da capacidade antioxidante, em pacientes com DPOC, indicado por altas concentrações de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e Isoprostano-8 no condensado expiratório ^{20; 74; 75}. O aumento de H₂O₂ está relacionado à constrição da musculatura lisa *in vitro* ¹⁶.

Células inflamatórias geram EROs e nitrogênio que levam ao estresse oxidativo caso haja um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Em fumantes, os macrófagos alveolares liberam mais EROs que em não fumantes e a capacidade antioxidante do plasma está reduzida ⁷⁶. Os neutrófilos periféricos de portadores de DPOC liberam mais EROs que os de indivíduos normais não fumantes ⁷⁷. O aumento da liberação de EROs traz consequentemente o aumento da oxidação de antiproteases como a $\alpha 1$ -AT, podendo assim ativar as MMPs, aumentando a proteólise. O estresse oxidativo também pode ser indicado pela presença de biomarcadores indicativos de peroxidação lipídica no sangue ⁷³.

1.4.4 Apoptose

A apoptose é um mecanismo regulador de morte celular, que permite a eliminação do organismo de células indesejadas, danificadas ou infectadas. Ela é fundamental na manutenção da homeostase dos tecidos e se mantém em equilíbrio com a proliferação e diferenciação celulares ⁷⁸. A inflamação persistente e o estresse oxidativo, que ocorrem na DPOC, levam a uma regulação anormal da apoptose das células do trato respiratório, com rompimento dos citoplasmas celulares e liberação de mediadores inflamatórios que agravam ainda mais a doença ^{19; 78}.

A apoptose é considerada um mecanismo importante no desenvolvimento da DPOC, sendo um evento chave na patogênese da doença ⁷⁸, podendo persistir mesmo após a cessação do tabagismo ²⁰. Provavelmente, um aumento na apoptose das células estruturais (epiteliais e endoteliais) do parênquima pulmonar, não contrabalançado pelo aumento na proliferação celular, leva a destruição tecidual, contribuindo para a origem da DPOC ¹⁹.

O aumento da apoptose em células alveolares do enfisema foi inicialmente verificado em pulmões de pacientes com DPOC ²⁶ e também em um modelo de enfisema pulmonar dependente de apoptose pelo bloqueio do receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em roedores ⁷⁹. Em outro estudo, os autores

encontraram aumento de apoptose e diminuição da proteína VEGF nos pulmões de pacientes com enfisema induzido pelo cigarro ⁸⁰.

Tuder et al. ⁸¹ demonstraram a interação entre o estresse oxidativo e a apoptose no enfisema experimental. Seu grupo induziu enfisema em ratos Sprague-Dawley através do bloqueio dos receptores do VEGF e verificou que a inibição do estresse oxidativo por meio da administração de um mimético da superóxido dismutase anulou a apoptose de células alveolares, impedindo o desenvolvimento do enfisema. A Figura 2 representa, esquematicamente, um resumo de todos os mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC abordados até aqui, bem como dos processos de interação entre eles que levam às alterações encontradas na DPOC.

Figura 2: Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC. A fumaça do cigarro e outros irritantes atuam nas células epiteliais, macrófagos e LT CD8+, além de estimular a liberação de EROs. Esse estímulo desencadeia ativação de neutrófilos, fibroblastos, além do recrutamento de mais macrófagos e LT CD8+. Diversos mediadores são liberados nesse processo, o que gera estresse oxidativo, inflamação, desequilíbrio entre proteases e antiproteases, além de apoptose celular. O desequilíbrio entre proteases e antiproteases é acentuado nos portadores de doenças genéticas, como a deficiência de $\alpha 1$ -AT. Todos esses mecanismos interagem e levam juntos às alterações estruturais que caracterizam a DPOC. **Fonte:** Elaborado pela autora.

1.5 Matriz Extracelular

A MEC constituinte do parênquima pulmonar é composta por macromoléculas distribuídas em meio aquoso. Entre estas macromoléculas estão o colágeno, elastina, proteoglicanas, glicosaminoglicanas (GAGs) e glicoproteínas de adesão, que se organizam formando uma rede, que determina as propriedades mecânicas do tecido pulmonar. Os GAGs e proteoglicanas formam uma substância hidratada tipo gel, que é altamente resistente a forças compressivas. Nesse gel se inserem as proteínas fibrosas que dão ao tecido uma maior resistência às forças de estiramento ⁶⁴.

A MEC determina as propriedades biomecânicas do parênquima pulmonar através da interação de seus componentes com as células do trato respiratório, tendo importante papel regulatório na fisiologia e cinética destas células ⁸². Hoffman et al. demonstraram que a qualidade da matriz extracelular, incluindo conteúdo de elastina, estresse mecânico e integridade alveolar, influencia não só a capacidade regenerativa do pulmão como também e os padrões de proliferação celular em pulmões de camundongos adultos ⁸³.

Nos pulmões, as fibras colágenas em maior quantidade são do tipo I, III e IV, e sua deposição se dá de forma aleatória nesse tecido, formando o arcabouço estrutural da parede alveolar ⁷⁶. O colágeno fibrilar é vital para manter a arquitetura pulmonar normal, já que o colágeno do tipo I é o principal elemento estrutural do pulmão, compreendendo 50-60% da MEC ⁸⁴. As fibras colágenas do parênquima pulmonar são organizadas para formar uma rede axial de fibras que se estende das vias aéreas centrais até os ductos alveolares, uma rede periférica de fibras que se estende a partir da pleura e interstício do parênquima que liga os anteriores. Durante os processos de reparação pulmonar e nas fibroses em geral, o colágeno III é o primeiro a ser depositado, sendo mais tarde substituído pelo colágeno I ^{76; 82}.

As fibras elásticas pulmonares maduras são formadas por um cilindro central sólido composto por abundante material amorfo e homogêneo chamado elastina, que é envolvida por microfibrilas de perfil tubular ao corte transversal ⁷⁶. As microfibrilas são formadas por diversos tipos de glicoproteínas, principalmente fibrilina e fibulina. A elasticidade das microfibrilas ainda é controversa e seu papel no tecido pulmonar

precisa de mais estudos. A elastina é composta pela ligação cruzada de polipeptídeos flexível e insolúvel, organizada em fibras facilmente extensíveis. As fibras elásticas apresentam heterogeneidade estrutural significativa e estão ligadas mecanicamente ao colágeno, através de microfibrilas e/ou proteoglicanas ⁸². Tradicionalmente, a elastina é considerada responsável pelo recolhimento elástico pulmonar durante a respiração normal, mas um estudo recente sugere que tanto o colágeno quanto a elastina podem ser igualmente importantes na determinação da elasticidade pulmonar, independente do volume em que o pulmão se encontre ⁸⁵.

Existem diversos tipos de células no parênquima pulmonar, sendo as mais importantes do ponto de vista mecânico as contráteis como as células musculares lisas dos ductos alveolares e das paredes dos vasos além dos miofibroblastos e fibroblastos das paredes alveolares. As propriedades viscoelásticas do parênquima pulmonar são moderadamente afetadas pela atividade das células intersticiais. A propriedade mais importante dessas células é reparar e remodelar o tecido conectivo durante o crescimento ou após lesões, sendo responsáveis em longo prazo pela manutenção e remodelamento da composição e estrutura da MEC ⁸².

1.5.1 Remodelamento do Parênquima na DPOC

Na DPOC, as células inflamatórias e estruturais produzem citocinas associadas ao remodelamento. Alguns mediadores inflamatórios (IL-8, TNF- α , TGF- β , e LTB₄) dão origem a uma cascata de eventos que levam à DPOC, e acredita-se que esse processo inflamatório leva a apoptose de células estruturais e degradação tecidual. Então, as células epiteliais liberam outros mediadores ativando o recrutamento e proliferação de fibroblastos, síntese da matriz e, por fim, o remodelamento ⁸⁶. Entretanto, este último é um fenômeno bastante complexo, havendo evidências de que pode ser induzido também pelo estresse mecânico gerado na broncoconstrição e aplicado a diversos tipos celulares ⁸⁷. O estresse leva as células epiteliais a produzirem fatores que estimulam fibroblastos e a musculatura lisa na direção de um perfil

profibrótico ⁸⁶. Independente do mecanismo desencadeador da doença, o resultado é sempre a perda de ligações entre os alvéolos e aumento dos espaços alveolares ¹⁸.

Em relação à MEC, nas doenças do parênquima pulmonar, as complexas redes de elastina e colágeno se encontram remodeladas, refletindo alterações importantes das propriedades mecânicas e estruturais do tecido. Vlahovic et al. ⁸⁸ observaram um aumento na proporção de fibras elásticas e colágenas em pacientes enfisematosos submetidos a lobectomia. Foi demonstrado em pulmões de pacientes enfisematosos que as fibras de colágeno se rompem com maior facilidade sob forças mecânicas quando comparadas às fibras de pulmões normais ⁸². Estudos anteriores demonstraram que a degradação da elastina (hipótese elastase-anti-elastase) é um passo chave na patogênese da DPOC, já que as fibras elásticas estão entre as mais difíceis estruturas da matriz para reparar devido ao seu tamanho, complexidade molecular e a necessidade da ajuda de diversas proteínas para facilitar sua formação ⁷⁶. Anticorpos para o colágeno foram encontrados no soro de pacientes com enfisema, sugerindo que o colágeno é degradado ou danificado no enfisema pulmonar ⁸⁹. Em modelos experimentais de enfisema induzido por elastases, a degradação do colágeno também é evidente ^{90; 91}. Segundo Bergeron & Boulet ⁸⁶, há evidências de que o remodelamento pulmonar tem consequências na expressão clínica de doenças pulmonares obstrutivas, assim como no seu desenvolvimento e no declínio da função pulmonar.

1.6 Modelos experimentais de enfisema pulmonar

Os modelos experimentais de DPOC representam uma ferramenta importante, uma vez que possibilitam um melhor conhecimento da fisiopatologia da doença através da compreensão dos mecanismos envolvidos, em nível celular e molecular, no processo de destruição e remodelamento das fibras do parênquima pulmonar, além de permitirem a aplicação de novas abordagens terapêuticas ⁹². Entretanto, a utilização destes modelos apresenta algumas limitações, visto que a doença não ocorre de forma espontânea e nem

todas as características apresentadas em seres humanos conseguem ser mimetizadas experimentalmente^{92; 93}.

A metodologia de instilação intratraqueal de papaína, proposto por Gross et al., em 1964⁹⁴, foi o primeiro modelo original que conseguiu reproduzir enfisema pulmonar experimental em ratos. A partir desse modelo, derivaram uma série de estudos, que levaram ao desenvolvimento de diferentes modelos de enfisema pulmonar induzido por instilação ou nebulização de outras enzimas proteolíticas, que resultaram em alterações histológicas e fisiológicas semelhantes às encontradas no enfisema em humanos⁹⁵. Existem atualmente três principais abordagens experimentais que visam mimetizar a DPOC, compreendendo a inalação de estímulos nocivos, a instilação traqueal de enzimas degradantes de tecido para induzir lesões semelhantes as do enfisema e técnicas de manipulação genética que conduzem a um fenótipo semelhante ao da DPOC⁹².

O modelo que aparenta ser o mais próximo da doença humana é a exposição prolongada à fumaça de cigarro, já que é esta a principal substância responsável pelo desenvolvimento de enfisema em humanos^{92; 20}. O primeiro modelo animal induzido pela fumaça de cigarro foi desenvolvido por Wright et al. em 1990⁹⁶. Apesar de ser considerado o padrão ouro para modelos de enfisema, esse é um modelo caro e de progressão lenta da doença⁹⁶, já que utiliza em geral uma exposição de 6 a 12 meses⁹⁷. Além disso, demonstrou-se que a exposição à fumaça de cigarro provoca alterações morfológicas compatíveis com um enfisema leve, independente do tempo de exposição¹, limitação que levou os cientistas a buscarem novas abordagens para simular as alterações morfológicas e funcionais da doença humana.

Camundongos mutantes ou geneticamente modificados também podem desenvolver enfisema. A predisposição genética para a DPOC é uma importante área de pesquisa, tendo sido caracterizadas diversas linhagens animais propensas a desenvolver lesões similares ao enfisema^{98; 99; 100}. Manipulações monogênicas ou poligênicas têm sido amplamente propostas como possíveis mimetizantes da DPOC^{101; 102}. Estes modelos podem ser de grande ajuda na identificação das funções fisiológicas de genes distintos e dos mecanismos envolvidos na DPOC⁹². Entretanto, as lesões similares ao enfisema ocorrem, nesses modelos, principalmente devido a uma deficiente maturação pulmonar e não por uma lesão do tecido adulto^{103; 100}. Em alguns desses modelos, a deficiência de uma proteína também pode proteger o animal de indução de enfisema,

ajudando a identificar mediadores pró-inflamatórios ou protetores importantes da doença.^{40; 92; 104}.

O enfisema induzido por elastase é um modelo de fácil aplicação, altamente reprodutível e de baixo custo, já que uma única administração resulta rapidamente em características morfológicas e histológicas semelhantes a do enfisema, com distribuição homogênea das lesões^{105; 20}. Este modelo se correlaciona com a deficiência genética de alfa-1-antitripsina em humanos²⁰. O enfisema induzido por elastase pancreática de porco (PPE) leva a alterações da função pulmonar, hipoxemia, redução na capacidade de exercício, perda de massa corpórea, hipertensão pulmonar e hipertrofia ventricular direita, que são características da DPOC em humanos^{104; 106; 107; 108}. Após a lesão elastolítica, inicia-se imediatamente um alargamento dos espaços aéreos, seguido de inflamação, que progride, provavelmente, devido efeito de proteinases inflamatórias¹⁰⁹. Esse modelo é útil no estudo da DPOC, já que pode levar a um quadro mais acentuado de enfisema, com importante inflamação e lesão tecidual decorrentes da instilação de elastases, fornecendo assim informações sobre os mecanismos inflamatórios e de reparação tecidual e sobre a ação de proteinases endógenas^{92; 104}. No entanto, o método de indução de enfisema por instilação de enzimas não é fiel aos mecanismos encontrados na doença humana, mas é uma ferramenta útil especialmente quando o foco é em mecanismos de reparo tecidual no enfisema.⁹². O Quadro 2, a seguir, apresenta de forma resumida as vantagens e desvantagens dos modelos experimentais de indução do enfisema pulmonar abordados até aqui.

Quadro 2: Vantagens e desvantagens dos modelos de indução do enfisema pulmonar.

Modelo Experimental	Vantagens	Desvantagem
Instilação de Elastase	<ul style="list-style-type: none"> - Simples - Barato - Fácil aplicação - Resultados rápidos - Alta reprodutibilidade - Características morfológicas semelhantes à doença humana - Gravidade dependente da dose 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de componentes inflamatórios - Processo fisiológico é diferente do humano
Modelos Genéticos	<ul style="list-style-type: none"> - Reproduz a patologia humana, principalmente em relação à deficiência de $\alpha 1$-AT - Demonstra o papel das proteases no desenvolvimento da doença 	<ul style="list-style-type: none"> - Aspectos da patologia são reproduzidos apenas individualmente - Necessidade de mais estudos com relação a mecanismos inflamatórios
Fumaça de Cigarro	<ul style="list-style-type: none"> - Reprodução de aspectos relacionados com os processos inflamatórios da DPOC - Alterações nas vias aéreas semelhantes às da doença humana 	<ul style="list-style-type: none"> - Caro - Longo tempo para o início dos sintomas - Tempo de exposição variável - Gravidade de leve a moderada

Fonte: Adaptado de Ribeiro-Paes et al., 2012 ¹¹⁰ e Antunes et al., 2011 ²⁰.

1.6.1 O remodelamento pulmonar em modelos experimentais de enfisema

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de quantificar as fibras elásticas e as fibras de colágeno no enfisema pulmonar. Evidências morfométricas de tecidos pulmonares de humanos e animais demonstraram alterações dinâmicas das fibras da MEC durante o desenvolvimento do enfisema. Foi observado, em ratos, um aumento na espessura das fibras colágenas e elásticas nas paredes alveolares, quatro semanas após tratamento com elastase ¹⁰⁶. Finlay et al. ¹¹¹ compararam o remodelamento de fibras de colágeno e elástica em pulmões de pacientes que apresentavam câncer de pulmão e de ratos enfisematosos que receberam instilação de elastase pancreática de porco e

observaram que tanto em humanos quanto em ratos as fibras elásticas e de colágeno apresentavam-se fragmentadas porém com uma espessura maior que a apresentada pelo grupo controle. Rubio et al.¹¹² observaram um aumento da proporção de fibras de colágeno em ratos no oitavo dia após a instilação intratraqueal de elastase. Após a exposição à fumaça do cigarro por seis meses, camundongos C57BL/6 mostraram um aumento na hidroxiprolina e desmosina de duas a três vezes⁵⁶.

Em outro estudo, hamsters foram submetidos à inalação de PPE para análise de mRNA para produção de colágeno e elastina em diferentes tempos após a exposição (1,2,3,5,7 e 30 dias). Logo nas primeiras 24h, o grupo tratado apresentou aumento do intercepto linear médio (L_m), que se manteve até o 30º dia. A expressão dos genes para produção de elastina e colágeno já apresentaram um aumento no 1º dia, atingindo seus valores mais altos por volta do 3º dia e mantendo-se neste padrão até o 5º dia, no entanto no 30º dia estes valores retornaram aos basais¹¹³. Usando uma linhagem de camundongos transgênicos que superexpressavam a MMP-1 humana, Goldin et al.¹¹⁴ demonstraram desenvolvimento de enfisema, com uma diminuição do colágeno tipo III e aumento da complacência pulmonar; eles sugeriram que a perda de colágeno III foi mais importante no desenvolvimento do enfisema do que a alteração do colágeno I.

Pastor et al.¹¹⁵ estudaram a morfogênese do enfisema em ratos que receberam instilação de papaína, com ênfase no estudo das alterações ocorridas nas fibras elásticas nos tempos 12h, 3, 10 e 60 dias após. Em doze horas, observou-se uma resposta inflamatória com ruptura de fibras elásticas. Após 3 dias houve formação de novas fibras elásticas. Já após dez dias, o edema alveolar desapareceu e as fibras elásticas assumiram uma morfologia normal, muito embora existissem fragmentos destas fibras elásticas dispersos pelo parênquima. E, finalmente após 60 dias observou-se um aumento do L_m , juntamente com um aumento da fragmentação das fibras do parênquima e um acúmulo de fibras elásticas e de colágeno, caracterizando um remodelamento desordenado.

Em um estudo anteriormente desenvolvido em nosso laboratório, Anciães et al.¹¹⁶, fizeram uma análise temporal do modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por instilação de papaína e avaliaram as alterações funcionais e histopatológicas nos tempos, 1, 3, 15, 28 e 40 dias após a indução do enfisema. Apesar de a lesão tecidual ter sido detectada através da diminuição da elastância do tecido e do

aumento do intercepto linear médio somente 28 dias após a indução da doença, já foi observado a partir do 15^o dia um aumento da deposição de colágeno no grupo instilado com papaína enquanto que o aumento da deposição de fibras elásticas só foi observado no 40^o dia após a indução. Em nenhum momento, neste estudo foi observada redução da proporção tanto das fibras de colágeno quanto das fibras elásticas. Posteriormente nós apresentamos o mesmo padrão no remodelamento das fibras de colágeno em enfisema induzido por fumaça do cigarro (CS) e por PPE em camundongos, com um aumento na quantidade de colágeno tipo III. Com relação às fibras elásticas, observou-se apenas um aumento na fibrilina associado a um aspecto fragmentado dessas fibras nos animais expostos a CS, enquanto que nos animais expostos à PPE, houve um aumento da elastina, sugerindo um remodelamento mais defeituoso no modelo induzido pro CS, provavelmente devido à lesão inflamatória crônica e persistente causada pela fumaça de cigarro ¹¹⁷.

Até agora, apenas alguns estudos conduzidos em tecidos retirados de pulmões humanos com câncer ¹¹⁸ e em pulmões de cobaias submetidas à indução de enfisema por fumaça em cigarro ^{41; 50; 119} mostraram alguma redução de fibras da ECM, mesmo que não significativa, durante o desenvolvimento da doença. Nenhum estudo anterior identificou redução de fibras da ECM no modelo experimental de enfisema induzido por elastase em camundongos.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de já existirem estudos contemplando a análise de MEC em modelos experimentais de enfisema, ainda não foi realizado nenhum estudo experimental que analise de forma detalhada os subtipos de colágeno existentes no parênquima pulmonar bem como os diferentes componentes das fibras elásticas em curtos espaços de tempo após a indução da doença. Considerando que a grande maioria dos estudos até agora analisou os componentes da MEC somente dias após a indução do enfisema por elastase, e que demonstraram um aumento de deposição de fibras no parênquima a partir do 21º dia, torna-se importante fazer a análise dessas fibras logo nas primeiras horas após a instilação intranasal de elastase. Essas análises podem evidenciar se ocorre redução das fibras constituintes da MEC em algum momento neste modelo experimental.

Este estudo foi desenvolvido de forma a contribuir para uma melhor compreensão da dinâmica do remodelamento das fibras constituintes da MEC no enfisema pulmonar bem como do papel das MMPs, especialmente das collagenases, na fisiopatologia da progressão do enfisema, almejando colaborar para a descoberta de novos alvos para o tratamento da DPOC.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Considerando que as alterações dos componentes da MEC interferem diretamente nas propriedades mecânicas, estruturais e funcionais do parênquima pulmonar durante o desenvolvimento do enfisema, temos como objetivo estudar de forma detalhada as alterações nas principais fibras constituintes da MEC no parênquima pulmonar durante o desenvolvimento do enfisema induzido por elastase em camundongos, bem como o papel de algumas metaloproteases que estão envolvidas nesse processo.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar os subtipos I e III das fibras de colágeno durante o desenvolvimento do enfisema pulmonar nos tempos 1 hora, 3 horas, 6 horas, 3 dias e 21 dias após a indução do enfisema pulmonar.
- Quantificar as fibras de elastina e as de fibrilina durante o desenvolvimento do enfisema pulmonar nos tempos 1 hora, 3 horas, 6 horas, 3 dias e 21 dias após a indução do enfisema pulmonar.
- Quantificar também a expressão gênica das metaloproteases (MMP-1a, MMP-1b, MMP-8, MMP-12 e MMP-13) que estão envolvidas no processo de destruição destas fibras nos tempos 1 hora, 3 horas, 6 horas, 3 dias e 21 dias após a indução da doença.
- Comparar os grupos que receberam instilação de PPE com respectivos grupos controle, para todos os dados obtidos.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) como protocolo de pesquisa n° 196/11 (Anexo 1). Para realização do projeto, foram utilizados 160 camundongos C57Bl/6 machos, com idade de 6-8 semanas e peso 20-25 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Os animais receberam os cuidados necessários de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” (NIH publication 85-23, revisado em 1985) e com a Lei Arouca (Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008).

Os animais foram mantidos acondicionados em baias específicas para camundongos (aproximadamente 5 animais/baia) com as seguintes medidas (425 X 266 X 185 mm) no Biotério do LIM-20 (Laboratório de Terapêutica Experimental I) da FMUSP. Todos os animais foram alimentados com água e ração *ad libitum* e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas em temperatura ambiente de 20 ± 2 °C, sendo cuidados por profissional treinado e capacitado durante todo o período do estudo.

4.2 Indução do Enfisema

A indução do enfisema pulmonar foi realizada utilizando PPE (Elastase Type I/ E-1250, Sigma Aldrich). Cada animal foi devidamente anestesiado através de aplicação intramuscular de Xylazina (5mg/kg) e Ketamina (40mg/kg) e recebeu 50µL de solução de elastase em solução salina fisiológica (SF - 0,9% NaCl), com 0,667UI de

concentração, através de instilação intranasal. Nos grupos controles, os animais receberam instilação nasal de 50µL de SF - 0,9% NaCl, veículo da elastase.

4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram separados em dois grandes grupos de acordo com a composição da instilação intranasal (SF ou de PPE) que receberam, formando assim os grupos PPE e SAL. Posteriormente, esses animais foram divididos em 10 diferentes sub-grupos de acordo com o tempo de eutanásia (1 hora, 3 horas e 6 horas, 3 dias e 21 dias pós-instilação). Os grupos definidos foram os seguintes (A Figura 3 apresenta o esquema detalhado da separação de todos os grupos experimentais deste estudo.):

- Grupo SAL-1h: Animais que receberam instilação de SF e foram eutanasiados 1 hora após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).
- Grupo ELA-1h: Animais que receberam instilação de PPE e foram eutanasiados 1 hora após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).
- Grupo SAL-3h: Animais que receberam instilação de SF e foram eutanasiados 3 horas após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).
- Grupo ELA-3h: Animais que receberam instilação de PPE e foram eutanasiados 3 horas após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).
- Grupo SAL-6h: Animais que receberam instilação de SF e foram eutanasiados 6 horas após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).

- Grupo ELA-6h: Animais que receberam instilação de PPE e foram eutanasiados 6 horas após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).
- Grupo SAL-3d: Animais que receberam instilação de SF e foram eutanasiados 3 dias após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).
- Grupo ELA-3d: Animais que receberam instilação de PPE e foram eutanasiados 3 dias após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).
- Grupo SAL-21d: Animais que receberam instilação de SF e foram eutanasiados 21 dias após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).
- Grupo ELA-21d: Animais que receberam instilação de PPE e foram eutanasiados 21 dias após a instilação, n=16 (n=8 para análises referentes à expressão gênica, n=8 para análises histológicas).

Figura 3: Esquema do protocolo de pesquisa. **A.** Divisão dos grupos para as técnicas de imuno-histoquímica. **B.** Divisão dos grupos para realização da RT-PCR. **Fonte:** Elaborado pela autora. Imagem do camundongo cortesia de: Alessandra, disponível em: <<http://www.clker.com/clipart-black-mouse-c57bl-6.html>>.

4.4 Retirada e Fixação dos Pulmões para Histologia

Nos tempos pré-determinados, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de Thiopental (50mg/kg) e posteriormente eutanasiados por meio de exsanguinação da veia cava inferior para retirada dos pulmões, em bloco, via uma esternotomia mediana em suas caixas torácicas. Após a coleta dos pulmões, as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos brancos identificados com a etiqueta para descarte de carcaças, devidamente preenchida, de acordo com a Cartilha de orientação de descarte de resíduo no sistema FMUSP-HC ¹²⁰, para serem posteriormente enviadas para cremação.

Os pulmões dos animais foram então fixados em formaldeído (4%) sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24 horas com o objetivo de homogeneizar a distensão do parênquima pulmonar. Após a fixação, os pulmões foram seccionados em partes menores e colocados em molde plástico para desidratação em Etanol 70%. Posteriormente, os fragmentos pulmonares foram incluídos em parafina e foi realizada microtomia de 5µm de espessura dos blocos para preparo das lâminas em silano (3-Aminopropiltriethoxysilano, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Essas lâminas foram utilizadas nas posteriores análises histológicas. Parte dessas lâminas, uma correspondente a cada animal, foi corada com Hematoxilina-eosina (HE) para avaliação do L_m.

4.5 Técnicas de Imuno-histoquímica

Para realizar a imunomarcagem do colágeno tipo I as lâminas silanizadas (impermeabilizadas com aminosilano) foram desidratadas em xilol quente por 30 minutos e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol, água corrente e tampão fosfato-salino (PBS) pH=7,4 por 10 minutos cada. Os epítomos antigênicos foram recuperados através do tratamento enzimático com pepsina bovina (10.000 unidades/ml) (Sigma-

Aldrich Corp., St.Louis, MO, USA) 8mg/ml, diluída em ácido acético 0,5M por 30 min a 37°C. Posteriormente as amostras de tecido pulmonar foram lavados por três vezes com PBS pH=7,4 e os sítios inespecíficos reativos a oxidação foram bloqueados com avidina e biotina (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) durante 10 min cada. Ainda, utilizamos outro bloqueio com leite em pó desnatado a 5% diluído em PBS durante 30 min em temperatura ambiente para inativação de epítomos inespecíficos. Finalmente, os espécimes foram incubados durante a noite a 4°C com anticorpo policlonal anti-COLI (1:60; Rockland, Limerick, PA, USA) obtido em coelho ¹²¹. Após este período, os cortes foram lavados com PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubados por 60 minutos com anticorpo secundários conjugado com Alexa Fluor 488® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com a origem do anticorpo primário, a temperatura ambiente em uma diluição de 1:200. Após lavagem com PBS/Tween₂₀ 0,05% as lâminas foram montadas em tampão glicina/PBS v/v, visualizadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51) e fotografadas por máquina digital Olympus QColor 5 acoplada ao microscópio para posterior análise em software específico.

Para a marcação do colágeno tipo III, foram utilizadas lâminas silanizadas, as quais foram desparafinizadas pela imersão em xilol por 30 min em estufa 60 - 65°C, seguida por 2 banhos no xilol por 10 min em temperatura ambiente e reidratação do tecido pela imersão em concentrações decrescentes de etanol (4 banhos de 5 min no Etanol 100%, 1 banho de 5 min no Etanol 95% e 1 banho de 5 min no Etanol 70%). Posteriormente, a recuperação antigênica foi realizada por meio de tratamento enzimático com pepsina bovina (10000 unidades/ml) (Sigma-Aldrich Corp., St.Louis, MO, USA) em ácido acético 0,5M, na concentração de 2mg por 500µl, por 30 min, em estufa a 37°C. Posteriormente os sítios inespecíficos foram bloqueados com leite em pó desnatado na concentração 5%, diluído em PBS, durante 30 min em temperatura ambiente. Finalmente, os fragmentos de pulmão foram incubados durante a noite, a 4°C, com anticorpo policlonal anti-COL III (1:30; Laboratório de Matriz Extracelular, FMUSP, São Paulo, BR) obtido em coelho ¹²². Após a incubação, os cortes foram lavados com PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubados durante 90 min, a temperatura ambiente, com o anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (Alexa Fluor 488® Goat Anti-Rabbit IgG – Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), diluídos 1:200 em

solução de azul de Evans a 0,006% em PBS. Finalmente, as lâminas foram montadas com glicerol tamponado. Os cortes foram avaliados em microscópio de fluorescência Olympus BX- 51 e fotografados por máquina digital Olympus QColor 5 acoplada ao microscópio para posterior análise em software específico. O Quadro 3 apresenta o esquema de anticorpos utilizados para a marcação dos colágenos I e III.

Quadro 3: Anticorpos utilizados nos estudos de imunofluorescência.

Marcador	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
COL I	Anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno tipo I (Rockland, Limerick, PA, USA)	Anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488® (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, EUA)
COL III	Anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno tipo III (Laboratório de Matriz Extracelular, FMUSP, São Paulo, BR)	Anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488® (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, OR, EUA)

A imuno-histoquímica foi realizada utilizando o método da estreptavidina-biotina-peroxidase para marcação de Elastina e da Fibrilina. Cortes dos pulmões foram desparafinizados e reidratados. Após o bloqueio da atividade da peroxidase endógena, foi feita recuperação antigênica. Para a Elastina a recuperação foi feita com pepsina à temperatura de 37 °C durante 1 hora e para a Fibrilina não houve recuperação antigênica. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários a 4 °C overnight. Para a marcação da elastina utilizamos como anticorpo primário o Elastin A-19 (SC-17580)¹¹⁷ anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), na diluição de 1:600 e, para Fibrilina, utilizamos Anti-Fibrillin 1 (ab21618 – Abcam, Cambridge, MA, EUA)¹¹⁷, na diluição de 1:200. O anticorpo secundário utilizado foi VECTASTAIN® Elite® ABC (Vector Elite PK-6105 ou PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e o cromógeno utilizado foi 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). As secções foram então contrastadas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, AL). Como

controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos dos procedimentos e algumas amostras foram incubadas com albumina sérica bovina (BSA). O Quadro 4 apresenta o esquema de anticorpos utilizados para a marcação da elastina e da fibrilina.

Quadro 4: Anticorpos utilizados nos estudos de imuno-histoquímica.

Marcador	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
Elastina	Anticorpo policlonal de cabra anti-elastina A-19 (sc-17580) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)	VECTASTAIN [®] Elite [®] ABC (Vestor Elite PK-6105 ou PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA)
Fibrilina	Anticorpo policlonal de coelho anti-fibrilina 1 (ab21618) (Abcam, Cambridge, MA, EUA)	VECTASTAIN [®] Elite [®] ABC (Vestor Elite PK-6105 ou PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA)

4.6 Avaliação Morfométrica

O índice L_m é um valor médio que representa a medida da área de superfície em relação ao volume dos espaços aéreos acinares ¹²³, sendo utilizado para o fim de estimar a área de trocas gasosas no pulmão. É o método morfométrico mais comumente utilizado na avaliação do enfisema ¹²⁴. É o comprimento médio de segmentos de reta em rândômicas linhas-teste que medem o espaço aéreo entre intersecções da linha com a superfície alveolar. Quanto maior o valor do L_m , maior é a destruição alveolar, já que os espaços aéreos entre as paredes alveolares estarão aumentados.

Para estudo da morfometria convencional foi utilizado o retículo de Weibel ¹²⁵ (Figura 3), com 100 pontos e 50 retas, acoplado à ocular de um microscópio óptico comum, com o qual foram realizadas as medidas do L_m de todos os grupos experimentais.

Figura 4: Modelo do retículo de Weibel utilizado nas análises morfométricas. Fonte: Adaptado de Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. 1966, p. 29¹²⁵.

Para quantificar o L_m foi separada uma lâmina referente a cada animal estudado de todos os grupos experimentais. Foi inicialmente realizada a contagem do número de vezes que as retas do retículo interceptavam as paredes alveolares em 15 campos aleatórios e não coincidentes de cada lâmina, em um aumento de 200X. Então, foram calculadas as médias dos números de intersecções entre os 15 campos de cada lâmina. O L_m foi calculado através da seguinte equação:

$$L_m = L_{total} / MI$$

Onde L_{total} é a somatória de todos os segmentos do retículo, realizada através da medida de cada segmento com uma régua do fabricante Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha) em um microscópio com o retículo. E MI é a média do número de vezes que as retas interceptam as paredes dos alvéolos em cada grupo experimental. Os valores de L_m foram expressos em micrometros (μm)¹²⁶.

4.7 Quantificação dos Colágenos tipo I e III, da Elastina e da Fibrilina no Parênquima Pulmonar

A análise morfométrica das lâminas para quantificação das fibras elásticas e colágenas em relação à área do parênquima pulmonar foi realizada por meio do método de análise de imagens. Para essa metodologia, foram fotografadas as lâminas coradas para Colágeno Tipo I, Colágeno Tipo III, Elastina e Fibrilina para todos os grupos experimentais (1 hora, 3 horas, 6 horas, 3 dias e 21 dias). Foram avaliados 10 campos aleatórios e não coincidentes para cada lâmina estudada. O resultado final de cada lâmina foi dado como a média de todos os seus campos avaliados.

Para a aquisição de imagens da Elastina e Fibrilina foi utilizado um microscópio óptico comum (Leica DM 4000B, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera fotográfica digital (DFC295, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça) que capturou as imagens e as enviou para um computador para serem processadas. Já para os Colágenos I e III foi utilizado um microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Corporation, Tóquio, Japão) e a captura de imagens foi realizada por máquina fotográfica digital Olympus QColor 5 (Olympus Scientific Solutions Americas, Waltham, MA, EUA) acoplada ao microscópio. Para análise de todas estas imagens utilizamos o programa Image Pro Plus 4.5 para Windows (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MS, EUA). A proporção de cada tipo de fibra foi calculada pelo software, através da relação de área corada por área de tecido, e dada em percentual (%).

4.8 Estudo da expressão gênica para Metaloproteases

4.8.1 Criopreservação de tecidos e Extração de RNA

Para a realização dos estudos moleculares, os pulmões dos animais foram preservados por congelamento. Para isso, o tecido pulmonar foi coletado conforme o protocolo de retirada dos pulmões para histologia, já descrito anteriormente. Entretanto, ao invés de seguir para o passo de fixação dos pulmões em formaldeído, os tecidos retirados dos animais foram lavados com solução de SF 0,9% e imediatamente imersos em solução de preservação RNAlater® (Ambion, Austin, TX, EUA), onde foram mantidos sob refrigeração contínua a 4 °C durante uma noite. A solução RNAlater® de armazenamento de tecidos é um reagente aquoso que rapidamente permeia tecidos para estabilizar e proteger o RNA celular. No dia seguinte, os tubos contendo as amostras foram centrifugados brevemente e o excesso de RNAlater® foi removido por aspiração. Os tecidos embebidos em RNAlater® foram então transferidos para tubos de criopreservação e armazenados em um freezer a -80 °C.

Os RNAs totais das amostras foram isolados com a utilização de uma solução comercial de caráter ácido, preparada com base no método de isotiocianato de guanidina /fenol/clorofórmio em etapa única ¹²⁷. Esse método se baseia no fato de que, em condições ácidas, o RNA total permanece na fase aquosa superior, enquanto que a maioria do DNA e as proteínas permanecem na interfase ou na fase orgânica inferior. Para dar início aos procedimentos, as amostras foram pesadas, fragmentadas, e o tecido pulmonar foi homogeneizado em presença de 1 ml de reagente de isolamento de RNA (TRI Reagent®, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) com o auxílio de um homogeneizador de alta frequência (Precellys® 24, Bertin Technologies, Rockville, MD, EUA), utilizando tubos preenchidos com esferas de cerâmica (Precellys CK14 2 ml Tubes, Bertin Technologies, Rockville, MD, EUA). Todo o procedimento foi realizado a uma temperatura de 4 °C, mantida através do sistema de resfriamento Cryolys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, FR) acoplado ao Precellys.

Parte das amostras foi homogeneizada em microtubos de 2,0ml com auxílio de um homogeneizador de tecidos portátil, que é operado manualmente, no lugar do Precellys. Após a homogeneização o procedimento de extração foi executado seguindo instruções fornecidas pelo fabricante. Após a etapa de precipitação com etanol absoluto, o RNA precipitado foi lavado com etanol 75% e os precipitados de RNA foram secos em um fluxo laminar. O RNA assim extraído foi ressuspensionado em água livre de RNase e armazenado em freezer -80 °C para posterior utilização.

4.8.2 Análise da Qualidade do RNA

A qualidade do RNA extraído foi verificada pela eletroforese em gel de agarose a 1%. A eletroforese é um método usado em biologia molecular para separar macromoléculas, tais como proteínas ou ácidos nucleicos, baseado em propriedades físicas como o tamanho, forma e carga elétrica. Através de uma eletroforese em gel de agarose, é possível deduzir a integridade do RNA através da visualização das bandas 28S e 18S de RNA ribossomal.

As amostras de RNA obtidas foram ressuspensionadas em 100µl de água cuja RNase foi inativada pelo tratamento com dietilpirocarbonato (DEPC) e desnaturadas a 65 °C por 10 minutos. O gel de agarose foi preparado em cuba de eletroforese na concentração de 1% (massa/volume) com tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA). Foram preparados 5µl de solução para cada amostra de RNA, com a composição de 3µl de água DEPC, 1µl da amostra e 1µl de tampão Gel Loading Dye, Blue (6X) (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA). Cada solução contendo uma amostra foi pipetada em um poço do gel imerso em tampão TBE 0,5X na cuba de eletroforese e, então, foi aplicada uma corrente elétrica de 50 volts durante 40 minutos. Após este tempo, os géis foram corados sob agitação, por 20 minutos, em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e, finalmente, fotografados em câmara escura. As amostras que apresentaram as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S (Figura 5) bem

definidas foram consideradas de boa qualidade e puderam ser utilizadas nas etapas seguintes.

Figura 5: Exemplo de uma fotografia de eletroforese em gel de agarose. Podem-se ver as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S bem definidas.

4.8.3 Quantificação do RNA total

O total de RNA das amostras foi quantificado por espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV/Vis), utilizando o espectrofotômetro NanoDropTM 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e o software NanoDrop ND-1000. Para cada amostra, foram utilizados 2 µl de material e o valor de concentração de RNA (ng/µl) dado pelo software foi anotado para possibilitar o cálculo do volume de cada

amostra necessário para a transcrição reversa em cDNA. As amostras que apresentaram relações da absorbância de 260 nm e 280 nm (260/280) entre 1,6 e 1,9 foram consideradas de boa qualidade e utilizadas nos experimentos subsequentes.

4.8.4 Transcrição reversa

Os RNAs totais que passaram pelo controle de qualidade foram submetidos à transcrição reversa para a síntese de cDNA (Ácido desoxirribonucléico complementar), que é uma molécula muito mais estável e mais conveniente para ser manipulada. Isso foi feito com a utilização de cerca de 5 µg de massa de RNA total.

As amostras de RNA total foram reversamente transcritas em cDNA utilizando um kit que tem como base a transcriptase reversa de vírus de leucemia murídea de Moloney (M-MLV RT, do inglês, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), iniciadores (*primers*) oligo dT e iniciadores aleatórios (High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). Os volumes dos componentes de cada reação foram determinados utilizando a tabela a seguir, conforme o manual do fabricante:

Tabela 1: Tabela de volumes dos reagentes para reação de transcrição reversa, adaptada do manual do kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix*.

Componente	Volume por Reação
RNA-to-cDNA Master Mix	4µl
RNA	_ µl
Água deionizada	_ µl
Volume final	20µl

O volume final de cada reação foi de 20µl, sendo 4µl do Master Mix e 16µl a soma do volume de RNA já calculado anteriormente com a água DEPC. Os ciclos de RT foram programados no termociclador da seguinte forma:

Passo 1 – 5 minutos a 25° C

Passo 2 – 30 minutos a 42° C

Passo 3 – 5 minutos a 85° C

Passo 4 – Espera a 4° C.

4.8.5 RT-PCR em tempo real

A expressão gênica para as metaloproteases de matriz MMP-1a, MMP-1b, MMP-8, MMP-12 e MMP-13 foi avaliada para todos os grupos experimentais por transcrição reversa, seguida de reação de polimerização em cadeia em tempo real (*Real Time* RT-PCR ou RT-PCR em tempo real).

O sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foi escolhido para o estudo da expressão da Mmp1a (NM_032006.3; ensaio Mm00473485), da Mmp1b (NM_032007.3; ensaio Mm00473493), da Mmp8 (NM_008611.4; ensaio Mm00439509_m1), da Mmp12 (NM_008605.3; ensaio Mm00500554_m1) e da Mmp13 (NM_008607.1; ensaio Mm00439491_m1), visto que já existem ensaios padronizados neste sistema para estes alvos. O sistema TaqMan® utiliza um par de iniciadores (*primers*) para amplificar por PCR uma região do mRNA de interesse. A identidade do produto amplificado é verificada pela hibridação de uma sonda marcada com fluorocromo (VIC ou FAM) na extremidade 5' e um atenuador (*quencher*) de emissão fluorescente na extremidade 3'. Se o produto de PCR gerado derivar genuinamente do mRNA de interesse, a hibridação da sonda ao produto amplificado fará com que o fluorocromo se afaste do atenuador o que permite que fótons sejam emitidos pelo corante fluorescente excitado. A adoção de uma mesma plataforma para

todos os alvos tem a vantagem de permitir que todos sejam amplificados com o mesmo perfil de variação térmica, o que otimiza o uso de reagentes e a montagem das reações.

As RT-PCRs em tempo real foram executadas em placas de 96 poços com a utilização de 100 ng de produto de transcrição reversa, 900 nM (final) de cada *primer* e 250 nM (final) de cada sonda marcada, em tampão de reação específico para ensaios TaqMan (2X Taqman Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA) em volume final de 20 µl. O perfil térmico das reações consistiu de 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 15 s de desnaturação a 95 °C e 1 min a 60 °C. As amplificações foram executadas em um termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para que a expressão dos genes de interesse seja comparável de experimento para experimento, as amplificações foram normalizadas utilizando o gene Gapdh como controle endógeno, já que este é um dos genes cuja expressão se mantém relativamente constante no pulmão dos camundongos independentemente dos estados fisiológicos pelos quais passa a célula. Diferente dos demais genes, a RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão do Gapdh foi realizada utilizando um corante que gera fluorescência quando ligado a DNA fita-dupla (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e também executada no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A expressão dos genes de interesse foi calculada utilizando o método de cálculo do Delta Ct (ΔCt), que corresponde ao número de Ct (*Cycle Threshold*) do gene alvo normalizado pelo Ct do gene referência Gapdh, através da seguinte fórmula matemática:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene referência}}$$

O valor de Ct corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente da reação cruze o limiar (*threshold*) acima do ruído de fundo (*background*), ou seja, a expressão do gene só é detectada quando o sinal fluorescente acumulado ultrapassa o *threshold*. Seguindo esse raciocínio, quanto menor o Ct, menor o número de ciclos de PCR necessários para detectar um gene, portanto maior sua expressão. Os valores de Ct para as amostras foram obtidos pela análise dos resultados dados pelo StepOne™ Software v2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Visto que a expressão do gene normalizador foi determinada com reagente diferente daquele utilizado para avaliar a expressão dos genes de interesse, para o cálculo do ΔC_t ser válido, as eficiências de amplificação do alvo (Ensaio Taqman) e da referência endógena (Ensaio SYBR Green) devem ser aproximadamente iguais. Se a eficiência de amplificação do Gapdh, ensaiada por SYBR Green, for a mesma da eficiência de amplificação dos genes de interesse (ensaiados pelo sistema TaqMan), nenhum ajuste é necessário. Caso contrário, ajustes matemáticos são mandatórios para que a expressão relativa dos genes de interesse possa ser calculada.

A determinação da eficiência de amplificação foi realizada utilizando diluições seriadas de produto de transcrição reversa das amostras de RNA utilizadas em nosso estudo. Uma amostra de cDNA que apresentou expressão gênica alta para os genes alvo foi selecionada e amplificada como um ensaio de PCR em tempo real utilizando os reagentes apropriados (SYBR Green para Gapdh e TaqMan para os genes-alvos). As curvas padrões de amplificação foram construídas utilizando como coordenadas o logaritmo na base 10 das concentrações dos produtos de transcrição reversa e o C_t obtido em cada diluição. A relação entre esses parâmetros foi determinada pela regressão linear. A equivalência da eficiência de amplificação de Gapdh às eficiências de amplificação dos genes-alvo foi verificada comparando visualmente a inclinação da reta que representa a curva padrão. Alternativamente a eficiência de amplificação pode ser calculada pela equação:

$$\text{Eficiência da PCR} = 10^{(1/S)} - 1 \text{ onde } S \text{ é a inclinação da reta de regressão}$$

4.9 Análise estatística

Todos os registros das informações dos dados obtidos foram armazenados em um banco de dados elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel. As análises estatísticas e a criação de gráficos foram realizadas através do software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA). Os dados obtidos para todas as variáveis estudadas foram analisados através do teste t de student, quando estes apresentavam

distribuição normal, ou do teste Mann-Whitney, quando os dados tinham distribuição não-normal, a fim de comparar os grupos SAL e ELA em todos os tempos deste estudo. Todos os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão relativo. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

As análises das medidas do L_m demonstraram que no grupo ELA-3h já existe um aumento deste parâmetro, sugerindo presença de destruição do parênquima pulmonar. O L_m apresentou aumento também nos tempos subsequentes (6 horas, 3 dias e 21 dias) nos grupos ELA comparado aos seus respectivos grupos controle SAL (Figura 6).

Figura 6: Valores do Intercepto Linear Médio – L_m no parênquima pulmonar dos grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo. Houve diferença significativa nos grupos ELA-3h (* $p=0,021$), ELA-6h (# $p<0,001$), ELA-3d (** $p=0,003$) e ELA-21d (§ $p<0,001$) com relação aos seus respectivos grupos controle. Os dados estão expressos como Média $\pm$ DP.

Na Figura 7 estão as fotomicrografias de parênquima pulmonar em todos os grupos SAL e ELA deste estudo. Fica evidente o aumento dos espaços aéreos distais nos grupos ELA comparado aos seus controles SAL, e o caráter progressivo deste aumento.

Figura 7: Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos dos grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo. Observa-se alargamento dos espaços aéreos distais nos grupos ELA comparados aos respectivos controles SAL (aumento de 400X, coloração HE).

As medidas de proporção de colágeno tipo I no parênquima pulmonar revelaram uma diminuição deste tipo de fibra somente no grupo ELA-3d em relação ao seu controle SAL-3d. Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e ELA nos outros tempos do estudo (Figura 8 e Figura 11).

Figura 8: Proporção de Colágeno do Tipo I no parênquima pulmonar dos grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo. Houve diferença significativa no grupo ELA-3d (* $p < 0,001$) com relação ao seu respectivo controle SAL-3d. Os dados estão expressos como Média $\pm$ DP.

As medidas de proporção de colágeno tipo III medida em percentual de volume no parênquima pulmonar mostraram diminuição deste tipo de fibra nos tempos 6 horas e 3 dias, e um aumento no tempo 21 dias nos grupos ELA com relação aos seus respectivos grupos controle SAL. Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e ELA nos tempos 1 hora e 3 horas (Figura 9 e Figura 13).

Com relação às medidas referentes à proporção de elastina medida em percentual de volume no parênquima pulmonar, houve uma diminuição desta fibra elástica no tempo 3 dias no grupo ELA comparado ao seu respectivo controle SAL-3d, enquanto que após 21 dias foi observado aumento da proporção de elastina no parênquima nos animais que receberam instilação de PPE comparados aos que receberam instilação de salina. Não houve diferença estatística para proporção de elastina no parênquima entre os grupos experimentais ELA e SAL para o restante dos tempos estudados (Figura 10 e Figura 12).

Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa nos grupos ELA com relação aos respectivos controles SAL, em nenhum dos tempos estudados, para a proporção de fibrilina no parênquima pulmonar. Os dados referentes à fibrilina estão demonstrados em gráficos na Figura 14.

Na avaliação da expressão gênica para as metaloproteases encontramos um aumento da produção de mRNA para MMP-8 (Figura 15) e MMP-12 (Figura 16) já nos tempos 3 horas e 6 horas. Nos tempos 1 hora, 3 dias e 21 dias observamos que não houve diferença significativa entre os grupos ELA e SAL para os valores de Delta CT, tanto para MMP-8 (Figura 15) quanto para MMP-12 (Figura 16).

A análise de Delta CT para MMP-13 revelou um aumento da expressão gênica desta metaloprotease nos grupos ELA comparados aos seus respectivos grupos controle SAL a partir de 1 hora após a instilação de PPE, expressão que se manteve aumentada nos tempos 3 horas e 6 horas. Não houve diferença entre os grupos experimentais designados para os tempos 3 dias e 21 dias (Figura 17).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos ELA, para os tempos estudados, com relação aos seus respectivos controles SAL, nas análises referentes à expressão gênica para MMP-1b, como mostram os gráficos da Figura 18.

Figura 9: Proporção de Colágeno do Tipo III no parênquima pulmonar dos grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo. Houve diferença significativa nos grupos ELA-6h ([#]p=0,002), ELA-3d (^{\$}p=0,038) e ELA-21d (^{**}p<0,001) com relação aos seus respectivos grupos controle SAL. Os dados estão expressos como Média±DP.

Figura 10: Proporção de Elastina no Parênquima Pulmonar dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo. Houve diferença significativa no grupo ELA-3d (§§ $p=0,014$) e no grupo ELA-21d (***) $p=0,012$) com relação aos seus respectivos controles. Os dados estão expressos em Média $\pm$ DP.

Figura 11: Fotomicrografias de colágeno tipo I no parênquima pulmonar (Imunofluorescência /Aumento de 400X). Houve uma diminuição na quantidade de colágeno tipo I no grupo ELA ELA-3d (B), comparado com seu respectivo controle SAL-3d (A). As setas apontam para as marcações de colágeno tipo I.

Figura 12: Fotomicrografias de elastina no parênquima pulmonar (Coloração HE /Aumento de 400X). Houve uma diminuição na quantidade de elastina no terceiro dia (A: Grupo SAL-3d; B:Grupo ELA-3d) com um aumento posterior em tais fibras em 21 dias (C: Grupo SAL-21d; D:Grupo ELA-21d), comparando os grupos ELA com seus respectivos controles SAL. As setas apontam para as marcações de elastina.

Figura 13: Fotomicrografias de colágeno tipo III no parênquima pulmonar (Imunofluorescência/Aumento 400X). Houve um declínio na quantidade de colágeno tipo III nos grupos ELA-6h (B) e ELA-3d (D), comparado aos seus respectivos controles SAL-6h (A) e SAL-3d (C). No grupo ELA-21d (F), houve aumento na quantidade de colágeno tipo III em comparação com o grupo controle SAL-21d (E). As setas apontam para as marcações de colágeno tipo III.

Figura 14: Proporção de Fibrilina no Parênquima Pulmonar dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) em nenhum dos grupos estudados com relação aos seus respectivos controles. Os dados estão expressos em Média $\pm$ DP.

Figura 15: Expressão Gênica para MMP-8 dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo, expressa por Delta Ct. Houve diferença significativa no grupo ELA-3h (* $p < 0,001$) e no grupo ELA-6h (§§§ $p < 0,001$) com relação aos seus respectivos controles. Os dados estão expressos em Média ± DP dos valores de Ct. Um menor valor de Ct representa uma maior expressão gênica.

Figura 16: Expressão Gênica para MMP-12 dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo, expressa por Delta Ct. Houve diferença significativa no grupo ELA-3h (^{##}p=0,033) e no grupo ELA-6h (^{***}p=0,035) com relação aos seus respectivos controles. Os dados estão expressos em Média±DP dos valores de Ct. Um menor valor de Ct representa uma maior expressão gênica.

Figura 17: Expressão Gênica para MMP-13 dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo, expressa por Delta Ct. Houve diferença significativa nos grupos ELA-1h ($^{\circ}$ $p=0,021$), ELA-3h ($^{+++}$ $p=0,007$) e ELA-6h (**** $p<0,001$) com relação aos seus respectivos controles. Os dados estão expressos em Média±DP dos valores de Ct. Um menor valor de Ct representa uma maior expressão gênica.

Figura 18: Expressão Gênica para MMP-1b dos Grupos SAL e ELA nos diferentes tempos do estudo, expressa por Delta Ct. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) em nenhum dos grupos experimentais com relação aos seus respectivos controles. Os dados estão expressos em Média $\pm$ DP dos valores de Ct. Um menor valor de Ct representa uma maior expressão gênica.

As reações de RT-PCR em tempo real realizadas para MMP-1a não detectaram expressão desta metaloprotease até o ciclo 40 na maioria das amostras em todos os grupos estudados, por essa razão não foi possível realizar as análises estatísticas previstas para essa variável.

Na Figura 19, estão demonstradas as curvas padrão de amplificação, calculadas para as reações de RT-PCR em tempo real. As eficiências de amplificação do alvo (Ensaio Taqman para MMP12 e MMP13) e da referência endógena (Ensaio SYBR Green para Gapdh) são aproximadamente iguais, já que suas curvas apresentam inclinações similares, validando assim o cálculo dos ΔC_t .

Cálculo de Eficiência da RT-PCR em Tempo Real

Figura 19: Curvas padrão utilizadas para comparar as eficiências dos Ensaio realizados em Taqman e os ensaios realizados em SYBR Green. Foram utilizados os genes MMP12 e MMP13 para Taqman e GAPDH para SYBR Green. As inclinações das retas são similares, o que demonstra que os ensaios utilizados nesse estudo têm eficiência similar. Os dados estão expressos em logaritmo na base 10 dos valores de C_t obtidos.

O quadro a seguir apresenta de forma resumida todos os resultados encontrados nesse estudo, incluindo os dados de L_m , da quantificação das fibras colágenas e elásticas, e da expressão gênica das metaloproteases nos tempos 1 hora, 3 horas, 6 horas, 3 dias e 21 dias. A direção das setas representa o aumento (seta para cima) ou redução (seta para baixo) do parâmetro exposto. Os traços representam que não houve alteração do parâmetro no tempo correspondente.

Quadro 5: Resumo dos resultados obtidos em todos os tempos do protocolo.

	1 Hora	3 Horas	6 Horas	3 Dias	21 Dias
L_m	—	↑	↑	↑	↑
Colágeno I	—	—	—	↓	—
Colágeno III	—	—	↓	↓	↑
Elastina	—	—	—	↓	↑
MMP-8	—	↑	↑	—	—
MMP-13	↑	↑	↑	—	—
MMP-12	—	↑	↑	—	—

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os resultados de nosso estudo sugerem que o aumento dos espaços aéreos distais, verificado por meio da avaliação do L_m , tem ocorrência precoce neste modelo experimental, a partir de 3 horas, e permanece em todos os tempos subsequentes do protocolo (6 horas, 3 dias e 21 dias). Além disso, observamos que uma dose única de elastase provocou um aumento progressivo dos valores de L_m , o que sugere um processo contínuo de destruição tecidual^{128; 129; 130}.

A presença de um alargamento dos espaços aéreos distais em poucas horas após a indução do enfisema já está descrito em outros estudos experimentais, que abordam a fisiopatologia do enfisema. Artaechevarria et al.¹²⁸ estudaram a evolução do enfisema induzido pela instilação de PPE (6 unidades por 30g de PPE) comparando dois métodos de análise: avaliação por micro-CT e análise histológica. Ambos refletiram uma rápida progressão inicial da doença, com diferença nas medidas de L_m entre o grupo que recebeu PPE e o grupo controle já na 1ª hora. Da mesma forma, Kawakami et al.¹²⁹ demonstraram que a destruição do parênquima pode ser vista em análises histológicas a partir do 1º dia após a indução do enfisema por PPE (0.3 unidades de PPE em 30µl de salina), com um aumento do L_m significativo somente a partir de 1 semana. Em outro estudo, Harada et al.¹³⁰ observaram alterações enfisematosas patológicas no 2º dia após instilação intratraqueal de PPE (30µg), com diferença no L_m apenas a partir do 7º dia. Apesar de os estudos apresentarem uma destruição tecidual precoce, existe uma variação entre eles quanto ao dia de início da lesão e esta diferença provavelmente ocorra devido às diferenças nas doses de PPE utilizadas.

Segundo a definição de enfisema, esta doença pulmonar é caracterizada pela destruição dos espaços aéreos distais, podendo ou não apresentar fibrose 1. A grande maioria dos estudos, tanto clínicos quanto experimentais, descreve aumento de deposição de fibras constituintes do parênquima pulmonar, caracterizando presença de reparo tecidual (remodelamento). É importante ressaltar, no entanto, que estas medidas são feitas, ou em pacientes que já estão em estágios mais avançados da doença ou, no caso dos modelos experimentais, somente dias após a indução da doença^{26; 113; 129; 131; 132}. Vlahovic et al.⁸⁸ observaram aumento da proporção de fibras elásticas e de

colágeno em amostras de pulmões de pacientes enfisematosos submetidos à lobectomia. Rubio et al.¹¹² observaram aumento da proporção de fibras de colágeno em pulmões de ratos no oitavo dia após a instilação intratraqueal de elastase. Kononov et al.¹⁰⁶ também observaram em ratos um aumento da espessura das fibras de colágeno e elásticas nas paredes alveolares quatro semanas após o tratamento com elastase. Anciães et al.¹¹⁶ encontraram, em camundongos, um aumento de fibras de colágeno e fibras elásticas no parênquima nos tempos 15 e 40 dias após instilação de papaína, respectivamente.

Poucos autores encontraram redução nas fibras componentes da MEC em algum momento na realização de seus estudos^{41; 133; 118; 50; 119}. Em um modelo experimental de enfisema induzido pela exposição à fumaça de cigarro por cobaias, após 1 mês de exposição, houve uma diminuição estatisticamente significativa ($*p<0,001$) na proporção do volume de colágeno nos animais expostos à fumaça, e em 6 e 12 meses de exposição, a proporção de colágeno aumentou significativamente ($*p<0,02$, $*p<0,03$, respectivamente). Quanto à proporção de volume de elastina, foi encontrado um aumento nos animais expostos à fumaça somente após 12 meses⁴¹. Ito et al.¹¹⁹ desenvolveram um modelo de enfisema em camundongos C57BL/6 por instilação de 1,2UI de PPE e três semanas após a instilação foi observado um aumento estatisticamente significativo de 45% no teor de colágeno total ($*p=0,002$) e uma diminuição não significativa de 13% no teor total de elastina de todo o pulmão ($*p=0,16$). D'armiento et al.⁴⁹ observou aumento de peptídios provenientes da quebra de colágeno em BAL de camundongos expostos à fumaça de cigarro após 1 dia de exposição, enquanto que em tempo posterior, quando o enfisema já estava instalado, foi detectado um aumento da depósito destas fibras. Este é o primeiro estudo no qual se avalia tanto a deposição de alguns componentes da MEC quanto o papel de algumas das metaloproteases, envolvidas na destruição destes, em curtos espaços de tempo após a instilação de elastase para indução do enfisema pulmonar.

As fibras de colágeno tipo I e tipo III são os principais elementos estruturais do pulmão e são fundamentais para a manutenção da arquitetura pulmonar normal, o que sugere que as alterações na estrutura da parede alveolar são consequências de alterações na composição dos tipos de colágeno no tecido⁸⁴. Em nosso estudo, a avaliação da proporção de colágeno tipo I no parênquima pulmonar demonstrou uma diminuição desta fibra 3 dias após a instilação de PPE. No entanto, após 21 dias não observamos

mais diferença entre os grupos Salina e PPE. A avaliação da proporção de colágeno tipo III revelou uma diminuição deste tipo fibrilar já em 6 horas após instilação de PPE, que se manteve até 3 dias. No 21º dia, observamos um aumento na deposição deste tipo de colágeno no grupo PPE comparado ao seu grupo controle Salina. Em estudo prévio, desenvolvido por nosso grupo, compararmos o remodelamento do parênquima nos dois modelos experimentais de enfisema (exposição ao fumo e instilação de PPE) mais descritos na literatura e utilizados em nosso laboratório. Também observamos um aumento da proporção de colágeno tipo III e não do tipo I nos dois modelos propostos, sendo que no modelo do fumo este aumento foi maior ¹¹⁷. A proporção relativa entre os colágenos tipos I e III determina a maleabilidade e a rigidez das fibras do colágeno total, uma vez que o colágeno tipo I é o mais rígido quando comparado ao tipo III ⁸². Nossos achados podem ajudar a explicar por que, em modelos experimentais de enfisema, as fibras de colágeno se rompem em tensões correspondentes as de uma respiração normal ¹³⁴, perpetuando, desta forma, o processo de destruição tecidual e a progressão da doença.

Já as fibras elásticas, formadas predominantemente por elastina e fibrilina, são consideradas os principais componentes da MEC responsáveis pela propriedade de recolhimento elástico dos pulmões ^{86; 135}. A fibrilina participa da formação dos polímeros de elastina servindo como um arcabouço para deposição destes ⁷⁶. Camundongos deficientes em elastina ou em proteínas envolvidas na formação desta, como a fibrilina-1 apresentam enfisema já ao nascer ^{136; 137}. Em pacientes que apresentam enfisema, já está demonstrada uma associação entre a redução de fibrilina-1 no parênquima pulmonar e o desenvolvimento desta doença ¹³⁵.

O aumento na proporção de elastina nos pulmões dos camundongos após 21 dias da instilação de elastase já foi descrito na literatura ^{88; 116; 117}. Apesar de termos encontrado um aumento na quantidade de elastina no 21º dia, as análises histológicas revelam alguns pontos do parênquima pulmonar com um maior depósito deste componente, demonstrando haver uma reposição não uniforme e desorganizada das novas fibras. Alguns estudos indicam que, apesar do aumento do conteúdo de elastina após o desenvolvimento de enfisema, é muito provável que as fibras resultantes do processo de reparação tecidual não apresentem a mesma funcionalidade que as existentes antes da instalação do enfisema ¹¹¹. Isto ocorre devido ao alto grau de

complexidade para a formação das fibras elásticas ⁷⁶, e ao processo de reparo destas fibras que ocorre de maneira desorganizada ¹¹¹, resultando em fibras que não apresentam uma configuração estrutural adequada para manutenção do recolhimento elástico pulmonar ^{76; 106}, o que leva ao comprometimento da função pulmonar.

Os resultados de Delta CT obtidos através da técnica de RT-PCR em tempo real demonstraram aumento da expressão gênica para produção de MMP-8, -12 e -13, já nas primeiras horas após a instilação de PPE. Após 1 hora da indução da doença observamos um aumento somente da expressão de MMP-13 que se manteve nos tempos 3 e 6 horas. Enquanto que as MMPs -8 e 12 apresentaram aumento em tempos posteriores, 3 e 6 horas. Até agora, estudos anteriores mostraram um aumento da produção de MMP-8 e -13 em camundongos somente após a exposição prolongada à fumaça de cigarro ⁴⁰ ou nos pulmões de pacientes com DPOC estabelecida ^{60; 28}. A MMP-8 e MMP-13 são descritas principalmente como collagenases. A MMP-13 é produzida principalmente por neutrófilos e está envolvida na destruição de colágeno tipo I ¹³⁸, enquanto que a MMP-8, denominada collagenase-tipo II, é descrita como uma das principais proteases envolvidas no início do processo de destruição do colágeno na inflamação, principalmente dos tipos I e II. Entretanto, outros tipos de colágeno (tipo III), fibronectina e elastina também são reconhecidos como substratos para ação desta metoloprotease ⁶¹. O aumento na expressão gênica para MMP-13 e -8, a partir da primeira e terceira hora após instilação PPE, respectivamente, sugere a importância de tais collagenases no início da destruição do parênquima pulmonar.

A MMP-12 é liberada predominantemente por macrófagos e é considerada uma das principais enzimas envolvida na destruição de elastina e consequente desenvolvimento do enfisema em roedores ¹³⁸. Camundongos manipulados geneticamente, deficientes em MMP-12, quando expostos a um protocolo de exposição à fumaça de cigarro, não apresentam aumento do número de macrófagos e também não desenvolvem enfisema após o período de exposição ⁹⁷. Nossas análises mostraram que, nos animais que receberam instilação de PPE, há um aumento da expressão gênica para MMP-12 em tempos anteriores (3 e 6 horas) ao qual detectamos redução de proporção de elastina no parênquima (3 Dias), com posterior aumento da proporção destas fibras no 21º dia após a instilação. Estes dados reforçam a já estabelecida importância desta MMP na quebra da elastina constituinte da MEC ^{39; 40}.

Não observamos diferenças entre os grupos experimentais nos diferentes tempos estudados quando avaliamos a deposição de fibrilina. Alguns estudos sugerem que esta proteína também é substrato da MMP-13¹³⁹ e, embora tenhamos notado um aumento na expressão gênica para esta MMP, em nosso modelo experimental não foi observada uma relação entre o aumento desta metaloprotease e a quantidade de fibrilina.

Desde que D'Armiento et al.⁴⁹ demonstraram o desenvolvimento de enfisema, logo após o nascimento, em um modelo de camundongo transgênico que superexpressa a MMP-1 humana no pulmão, esta MMP é considerada importante no desenvolvimento do enfisema. Em outro estudo, Shiomi et al.⁵³ utilizou uma linhagem de heterozigotos em um modelo de camundongo transgênico que superexpressa a MMP-1 humana e observou o desenvolvimento de enfisema aos 12 meses, com uma diminuição no colágeno do tipo III e aumento da complacência pulmonar. Eles sugeriram que a perda de colágeno III foi uma maior determinante do enfisema do que a perda de colágeno I. Entretanto, não encontramos um aumento da expressão gênica, em qualquer ponto do tempo para MMP-1a e MMP-1b com a utilização deste modelo experimental.

A expressão da collagenase intersticial (MMP-1) tem sido bastante estudada e sua inibição sugerida como terapia para a DPOC. Usando análise da sequência genômica e análise de expressão destas enzimas, alguns pesquisadores demonstraram que nem a MMP-1a nem a MMP-1b se comportam da mesma maneira que a MMP-1 humana na presença da fumaça de cigarro, sugerindo que esses genes propostos como ortólogos da MMP-1 fornecem limitações para sua análise em modelos de enfisema induzido por fumaça de cigarro¹⁴⁰. Os resultados referentes às MMP-1a e -1b sugerem que estas MMPs não apresentam um papel efetivo no processo de desenvolvimento do enfisema neste modelo experimental.

No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve uma diminuição de alguns tipos de fibras constituintes da MEC já em tempos iniciais após a indução enfisema. Além disso, observamos um intervalo de tempo entre a diminuição e o posterior aumento das fibras de elastina e colágeno tipo III, o que sugere a não concomitância dos processos de destruição e reparo tecidual no parênquima pulmonar. Além disso, demonstramos que existe um intervalo de tempo entre os aumentos na expressão gênica para MMPs e o aumento da quantidade de fibras parenquimatosas.

Nossos resultados corroboram com os estudos que descrevem a importância não somente das elastases e da quebra das fibras elásticas, mas também das collagenases e dos diferentes tipos de colágeno no desenvolvimento do enfisema. Tanto que observamos aumento da expressão gênica das metaloproteases envolvidas predominantemente na quebra de colágeno (MMP-8 e MMP-13) antes do aumento da expressão gênica para MMP-12, envolvida na quebra da elastina.

No entanto, para um melhor entendimento do papel das diferentes metaloproteases envolvidas no desenvolvimento e progressão do enfisema é preciso considerar-se as diferentes células inflamatórias envolvidas na patogênese da doença e o papel das enzimas liberadas por estas células na destruição tecidual. Com exceção dos estudos em pacientes que apresentam deficiência em alfa 1 anti-tripsina, nos quais a elastase neutrofílica é considerada a principal protease envolvida na destruição das paredes alveolares, o entendimento das principais enzimas envolvidas no desenvolvimento e progressão do enfisema tem se mostrado difícil ⁴². A maior parte das MMPs é produzida como pró-enzimas que precisam ser ativadas por conversão proteolítica, ressaltando a importância da interação entre as diferentes proteases para que ocorra este processo ^{121; 29}.

A compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na DPOC ainda está em um estágio inicial em comparação com o conhecimento de outras doenças respiratórias como a asma. O estudo da composição da MEC ao longo do desenvolvimento do enfisema é importante não somente para um melhor entendimento do comportamento mecânico deste tecido, mas também para auxiliar em um maior entendimento da dinâmica dos processos fisiopatológicos envolvidos no remodelamento tecidual.

Ainda não existe um tratamento eficaz para a recuperação do parênquima pulmonar após a instalação do enfisema e, atualmente, somente estão disponíveis para o tratamento da DPOC fármacos que controlam os sintomas da doença. Uma melhor compreensão da constituição das fibras do parênquima pulmonar e dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de remodelamento se torna importante para considerar potenciais alvos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam impedir a progressão do enfisema.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

No modelo experimental proposto, as análises das alterações nas principais fibras constituintes da MEC no parênquima pulmonar e do papel de algumas metaloproteases envolvidas nesse processo nos permitem concluir que:

- O processo de reparo tecidual ocorreu principalmente devido ao aumento de depósito de elastina e colágeno tipo III em momentos posteriores aos quais ocorreu aumento na expressão das MMPs -13, -8 e 12 e diminuição destas fibras, sugerindo que o processo de destruição e reparo tecidual não ocorrem simultaneamente.
- O remodelamento dos diferentes tipos de colágeno e o papel das collagenases é tão importante quanto o remodelamento das fibras elásticas e o papel da MMP-12 no desenvolvimento do enfisema.
- As metaloproteinases de matriz têm um papel importante no desenvolvimento do enfisema induzido por elastase em camundongos

8. ANEXOS

APROVAÇÃO

O Coordenador da CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **08.06.2011**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **196/11** intitulado: **"ESTUDO DAS FIBRAS CONSTITUINTES DA MATRIZ EXTRACELULAR E DA EXPRESSÃO DE METALOPROTEASES DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO ENFISEMA PULMONAR INDUZIDO POR ELASTASE EM CAMUNDONGOS"** que utilizará **80 Camundongos C57/BI6**, apresentado pelo Departamento de **Clínica Médica**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

Pesquisador (a) Executante: Fabíola Santos Zambon Robertoni

CEP-FMUSP, 08 de junho de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

Anexo 1: Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética (CEP-FMUSP)

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

- 1 GOLD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD*. 2014 [Citado 21 Jan 2014]. Disponível em: <http://www.goldcopd.org>.
- 2 Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2006 Sep;28(3): 523-32.
- 3 Jardim JR, Oliveira JA, Nascimento O. II Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *J Bras Pneumol*. 2004;30.
- 4 Cazzola M. From large clinical trials to management of COPD in the real world. *Ther Adv Respir Dis*. 2009; 3(1):39-46.
- 5 Eisner MD, Balmes J, Katz PP, Trupin L, Yelin EH, Blanc PD. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Health*. 2005 May 12;4(1):7.
- 6 Instituto Nacional do Câncer (INCA). *Tabagismo: Dados e números*. [Citado 05 Jan 2015]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/tabagismo>.
- 7 Owen CA. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008 Jun;3(2):253-68.
- 8 WHO. World Health Organization. *Chronic Respiratory Diseases (COPD): Burden*. 2014 [Citado 21 Jan 2014]. Disponível em: <http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/>.
- 9 NHLBI. National Heart, Lung, and Blood Institute. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD essentials for health Professionals*. US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. 2013 [Citado 21 Jan 2014]. Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/educational/copd/campaign-materials/index.htm#referencecard>.
- 10 IHME. Institute for Health Metrics and Evaluation. *Search Global Burden of Disease Data, All Ages*. 2010 [Citado 21 Jan 2014]. Disponível em: <http://www.healthmetricsandevaluation.org/search-gbd-data?s=COPD>.
- 11 Ciapponi A, Alison L, Agustina M, Demián G, Silvana C, Edgardo S. The Epidemiology and Burden of COPD in Latin America and the Caribbean: Systematic Review and Meta-Analysis. *COPD*. 2014 Jun;11(3):339-50.

- 12 WHO. World Health Organization. *WHO Global Infobase: Data for saving lives*. 2011. [Citado 31 Jan 2014]. Disponível em: <http://apps.who.int/infobase/Indicators.aspx?ISO3=bral>.
- 13 Azambuja R, Bettencourt M, Costa CH, Rufino R. Panorama da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista HUPE* (Rio de Janeiro). 2013;12(2):13-8.
- 14 Menezes AMB, Padilla RP, Jardim JRB, Muiño A, Lopez MV, Valdívia G, Oca MM de, Talamo C, Hallal PC, Victora CG. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005 Nov 26;366(9500):1875-81.
- 15 Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006 Nov;3(11):e442.
- 16 Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med*. 2003;54:113-29.
- 17 ALAT. Associação Latino-americana de Tórax. *GOLD: Estratégia Global para o diagnóstico, a Conduta e a Prevenção da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica: Relatório do NHLBI/WHO Workshop*. 2001. [Acesso 15 Feb 2014]. Disponível em: http://www.goldpoc.com.br/arquivos/workshop_report.pdf.
- 18 Suki B, Lutchen KR, Ingenito EP. On the Progressive Nature of Emphysema, Roles of Proteases, Inflammation, and Mechanical Forces. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Sep 1; Vol 168(5):516-21.
- 19 Cavalcante AG de M, Bruin PFC de. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. *J. bras. pneumol*. 2009 Dec; 35(12):1227-37.
- 20 Antunes MA, Rocco PR. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An Acad Bras Cienc*. 2011 Dec;83(4):1385-96.
- 21 Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. 1963. *COPD*. 2013 Mar;10 Suppl 1:3-8.
- 22 Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, Babyak MA, Kaschak M. Experimental emphysema. Its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health*. 1965 Jul;11:50-8.
- 23 Saetta M, Turato G, Timens W, Jeffery PK. Pathology of chronic obstructive pulmonary Disease. *Eur Respir Mon*. 2006;38:159-76.

- 24 Betsuyaku T, Yoshioka A, Nishimura M, Miyamoto K, Kondo T, Kawakami Y. Neutrophil elastase associated with alveolar macrophages from older volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Feb;151(2 Pt 1):436-42.
- 25 Barnes PJ. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev*. 2004 Dec;56(4):515-48.
- 26 Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal B, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinase A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*. 2000 Mar;117(3):684-94.
- 27 Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM.. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jul;156(1):240-7.
- 28 Lee EJ, In KH, Kim JH, Lee SY, Shin C, Shim JJ, Kang KH, Yoo SH, Kim CH, Kim HK, Lee SH, Uhm CS. Proteomic analysis in lung tissue of smokers and COPD patients. *Chest*. 2009 Feb;135(2):344-52.
- 29 Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*. 2011 Jul;38(1):191–208.
- 30 Shapiro SD. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes: potential roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Dec; 150(6 Pt 2): S160–4.
- 31 Churg A, Zhou S, Wright JL. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J*. 2012 Jan;39(1):197-209.
- 32 Janoff A, Raju R, Dearing LR. Levels of elastase activity in bronchoalveolar lavage fluids of healthy smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis*. 1983 May;127(5):540-4.
- 33 Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucl. Acids Res*. 2012 Jan;40(Database Issue):D343-50.
- 34 Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):221-33.

- 35 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.
- 36 Snider GL, Hayes JA, Franzblau C, Kagan HM, Stone PS, Korthy AL. Relationship between elastolytic activity and experimental emphysema-induced properties of papain preparations. *Am Rev Respir Dis.* 1974 Sep; 110(3):254-62.
- 37 Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2000 Jul 27;343(4):269-80.
- 38 Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Kontinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest.* 1998 Sep;78(9):1077-87.
- 39 Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Jun;20(6):1100-2.
- 40 Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik PO, Thim K, Wright JL. Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax.* 2007 Aug;62(8):706-13.
- 41 Wright JL, Churg A. Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. *Am J Physiol.* 1995 Jan; 268(1 Pt 1):L17-20.
- 42 Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease c2: Pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax.* 2002 Sep;57(9):830-4.
- 43 Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):2002-4.
- 44 Imai K, Dalal S, Chen ES, Downey R, Schulman LL, Ginsburg M, D'Armiento J. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Mar;163(3 Pt 1):786-91.
- 45 LaPan P, Brady J, Grierson C, Fleming M, Miller D, Sypek J, Fu B. Optimization of total protein and activity assays for the detection of MMP-12 in induced human sputum. *BMC Pulm Med.* 2010 Aug 2;10:40.
- 46 Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, et al. Elevated MMP- 12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax.* 2006 Mar;61(3): 196-201.

- 47 Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, Rodriguez MW, Favoreto S, Dolganov GM, Paquet AC, Erle DJ. A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Dec 1;172(11):1383-92.
- 48 Molet S, Belleguic C, Lena H, Germain N, Bertrand CP, Shapiro SD, Planquois JM, Delaval P, Lagente V. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm Res.* 2005 Jan;54(1):31-6.
- 49 D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, Berg RA, Chada K. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell.* 1992 Dec;71(6):955-61.
- 50 Selman M, Montaña M, Ramos C, Vanda B, Becerril C, Delgado J, Sansores R, Barrios R, Pardo A. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):L734-43.
- 51 Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 May;26(5):602-9.
- 52 Lanone S, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Ma B, Chen Q, Homer RJ, Wang J, Rabach LA, et al. Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest.* 2002 Aug;110(4):463-74.
- 53 Shiomi T, Okada Y, Foronjy R, Schiltz J, Jaenish R, Krane S, D'Armiento J. Emphysematous changes are caused by degradation of type III collagen in transgenic mice expressing MMP-1. *Exp Lung Res.* 2003 Jan-Feb;29(1):1-15.
- 54 Wallace AM, Loy LB, Abboud RT, D'Armiento JM, Coxson HO, Muller NL, Kalloger S, Li X, Mark Elliott W, English JC, Finley RJ, Paré PD. Expression of Matrix Metalloproteinase-1 in Alveolar Macrophages, Type II Pneumocytes, and Airways in Smokers: Relationship to Lung Function and Emphysema. *Lung.* 2014 Aug;192(4):467-72.

- 55 D'Armiento JM, Goldklang MP, Hardigan AA, Geraghty P, Roth MD, Connett JE, Wise RA, Sciurba FC, Scharf SM, Thankachen J, Islam M, Ghio AJ, Foronjy RF. Increased matrix metalloproteinase (MMPs) levels do not predict disease severity or progression in emphysema. *PLoS One*. 2013;8(2):e56352.
- 56 Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, and Wright JL. Tumor Necrosis Factor- α Drives 70% of Cigarette Smoke-induced Emphysema in the Mouse. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Sep 1;170(5):492-98.
- 57 Gosselink JV, Hayashi S, Elliott WM, Xing L, Chan B, Yang L, Wright C, Sin D, Paré PD, Pierce JA, Pierce RA, Patterson A, Cooper J, Hogg JC. Differential expression of tissue repair genes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Jun 15;181(12):1329-35.
- 58 Vernooy JHJ, Lindeman JHN, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EF. Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest*. 2004 Dec;126(6):1802-10.
- 59 Ilumets H, Ryttilä PH, Sovijärvi AR, Tervahartiala T, Myllärniemi M, Sorsa TA, Kinnula VL. Transient elevation of neutrophil proteinases in induced sputum during COPD exacerbation. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(7):618-23.
- 60 Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, Kawakami Y. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Jun;159(6):1985-91.
- 61 Skiles JW, Gonella NC, Jeng AY. The design, structure and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cur Med Chem*. 2001 Mar;8(4):425-74.
- 62 Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin Immunol*. 1993 Oct;92(4):537-48.
- 63 Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am. J. Resp. Crit. Care Med*. 1996 Feb;153(2):530-4.

- 64 Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*. 2008 Jun;31(6):1334-56.
- 65 Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Nov; 152(5 Pt 1):1666-72.
- 66 Sarén P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*. 1996 Nov 1;157(9):4159-65.
- 67 Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, Shapiro SD, Wright JL. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- α release. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Apr 15;167(8):1083-9.
- 68 Gadgil A, Duncan SR. Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008 Dec;3(4):531-41.
- 69 Hoidal JR, Fox RB, Lemarbe PA, Perri R, Repine JE. Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis*. 1981 Jan;123(1):85-9.
- 70 Ludwig PW, Hoidal JR. Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis*. 1982 Dec;126(6):977-80.
- 71 Lin JL, Thomas PS. Current perspectives of oxidative stress and its measurement in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2010 Aug;7(4):291-306.
- 72 Van der Toorn M, Smit-de Vries MP, Slebos DJ, de Bruin HG, Abello N, van Oosterhout AJ, Bischoff R, Kauffman HF. Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Nov;293(5):L1156-62.
- 73 MacNee W, Tudor RM. New paradigms in the pathogenesis of COPD I. *Proc Am Thoracic Soc*. 2009 Sep 15;6(6):527-31.
- 74 Dekhuijzen PNR, Aben KHH, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Sep;154(3 Pt 1):813-6.

- 75 Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Resp Crit Care Med*. 2000 Sep;162(3 Pt 1):1175-7.
- 76 Shifren A, Mecham RP. The Stumbling Block in Lung Repair of Emphysema: Elastic Fiber Assembly. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jul;3(5):428-33.
- 77 Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Feb;159(2):473-9.
- 78 Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res*. 2006;7(1):53.
- 79 Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman SH, Hirth P, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(11):1311-9.
- 80 Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Mar;163(3 Pt 1):737-44.
- 81 Tuder RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, Flores SC. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Jul;29(1):88-97.
- 82 Suki B, Bates JH. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Nov 30;163(1-3):33-43.
- 83 Hoffman AM, Shifren A, Mazan MR, Gruntman AM, Lascola KM, Nolen-Walston RD, Kim CF, Tsai L, Pierce RA, Mecham RP, Ingenito EP. Matrix modulation of compensatory lung regrowth and progenitor cell proliferation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Feb;298(2):L158-68.
- 84 Lang MR, Fiaux GW, Gillooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax*. 1994 Apr;49(4):319-26.

- 85 Yuan H, Kononov S, Cavalcante FS, Lutchen KR, Ingenito EP, Suki B. Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue strips. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Jul;89(1):3-14.
- 86 Bergeron C, Boulet LP. Structural Changes in Airway Diseases: Characteristics, Mechanisms, Consequences, and Pharmacologic Modulation. *Chest*. 2006 Apr;129(4):1068-87.
- 87 Tschumperlin DJ, Drazen JM. Mechanical Stimuli to Airway Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 2):S90-4.
- 88 Vlahovic G, Russel ML, Mercer RR, Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Dec;160(6):2086-92.
- 89 Micheali D, Fudenberg HH. Antibodies to collagen in patients with emphysema. *Clin Immunol Immunopathol*. 1974 Nov;3(2):187-92.
- 90 Kilburn KH, Dowell AR, Pratt PC. Morphological and biochemical assessment of papain-induced emphysema. *Arch Intern Med*. 1971 May;127(5):884-90.
- 91 Yu SY, Keller NR. Synthesis of lung collagen in hamsters with elastase-induced emphysema. *Exp Mol Pathol*. 1978 Aug;29(1):37-43.
- 92 Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2004;5(1):18.
- 93 Barnes PJ. The cytokine networks in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118(11):3546-56.
- 94 Gross P, Bajak MA, Tolker E, Kaschak M. Enzymatically produced pulmonary emphysema: a preliminary report. *J Occup Med*. 1964 Dec;6:481-4.
- 95 Fusco L, Pêgo-Fernandes P, Xavier A, Pazetti R, Rivero D, Capelozzi V, Jatene F. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Pneumologia*. 2002 Jan;28(1):1-7.
- 96 Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Dec;142(6 Pt 1): 1422-8.
- 97 Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *Am J Pathol*. 2003 Dec;163(6):2329-35.

- 98 Martorana PA, van Even P, Gardi C, Lungarella G. A 16-month study of the development of genetic emphysema in tightskin mice. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Jan;139(1):226-32.
- 99 Ranga V, Grahn D, Journey TM. Morphologic and phenotypic analysis of an outcross line of blotchy mouse. *Exp Lung Res*. 1983 May;4(4):269-79.
- 100 Martorana PA, Brand T, Gardi C, van Even P, de Santi MM, Calzoni P, Marcolongo P, Lungarella G. The pallid mouse. A model of genetic alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lab Invest*. 1993 Feb;68(2):233-41.
- 101 Shapiro SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klotho and marlboro mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Jan;22(1):4-7.
- 102 Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest*. 2000 May;117(5 Suppl 1):223S-7S.
- 103 Ito S, Bartolák-Suki E, Shipley JM, Parameswaran H, Majumdar A, Suki B. Early Emphysema in the Tight Skin and Pallid Mice: Roles of Microfibril-Associated Glycoproteins, Collagen, and Mechanical Forces. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Jun;34(6):688-94.
- 104 Mahadeva R, Shapiro S. Chronic obstructive pulmonary disease • 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002; 57(10):908-14.
- 105 Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Jan;133(1):149-69.
- 106 Kononov S, Brewer K, Sakai H, Cavalcante FSA, Sabayanagam CR, Ingenito EP, Subi B. Roles of mechanical forces and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1920-6.
- 107 Lüthje L, Raupach T, Michels H, Unsold B, Hasenfuss G, Kogler H, Andreas S. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. *Respir Res*. 2009 Jan 28;10:7.
- 108 Ito S, Ingenito EP, Brewer KK, Lauren DB, Harikrishnan P, Lutchen KR, Suki B. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. *J Appl Physiol* (1985). 2005 Feb;98(2):503-11.

- 109 Kuhn C 3rd, Starcher BC. The effect of lathyrogens on the evolution of elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1980 Sep;122(3):453–60.
- 110 Ribeiro-Paes JT, Stessuk T, Kozma RH. Cell Therapy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: State of the Art and Perspectives, Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Current Concepts and Practice, Dr. Kian-Chung Ong (Ed.), ISBN: 978-953-51-0163-5, InTech. 2012 [Citado 15 01 2015]. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/chronic-obstructive-pulmonary-disease-current-concepts-and-practice/cell-therapy-in-chronic-obstructive-pulmonary-disease-state-of-the-art-and-perspectives>.
- 111 Finlay GA, O'Donnell MD, O'Connor CM, Hayes JP, FitzGerald MX. Elastin and collagen remodeling in emphysema. A scanning electron microscopy study. *Am J Pathol*. 1996 Oct;149(4):1405-15.
- 112 Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba German, González-Mangado N. Oral N-Acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest*. 2004 Apr;125(4):1500-6.
- 113 Lucey EC, Goldstein RH, Stone PJ, Snider GL. Remodeling of alveolar walls after Elastase treatment of Hamsters. Results of Elastin and Collagen mRNA in situ hybridization. *Am J Respir Care Med*. 1998 Aug; 158(2):555-64.
- 114 Goldin GV, Wessells NK. Mammalian, lung development: the possible role of cell proliferation in the formation of supernumerary tracheal buds and in branching morphogenesis. *J Exp Zoo*. 1979 Jun;208(3):337-46.
- 115 Pastor LM, Sánchez-Gascón F, Girona JC, Bernal-Mañas CM, Morales E, Beltrán-Frutos E, Canteras M. Morphogenesis of rat experimental pulmonary emphysema induced by intratracheally administered papain: changes in elastic fibres. *Histol Histopathol*. 2006 Dec; 21(12):1309-19.
- 116 Anciães AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto TS, Moriya HT, Mauad T, Martins MA, Lopes FDTQS. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics (São Paulo)*. 2011;66(10):1797-803.
- 117 Lopes FDTQS, Toledo AC, Olivo CR, Prado CM, Leick EA, Medeiros MC, Santos ABG, Garippo A, Martins MA, Mauad T. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histol Histopathol*. 2013 Feb;28(2):269-76.

- 118 Cardoso WV, Sekhon HS, Hyde DM, Thurlbeck WM. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Apr;147(4):975-81.
- 119 Golovatch P, Mercer BA, Lemaître V, Wallace A, Foronjy RF, and D'Armiento J. Role for Cathepsin K in Emphysema in Smoke-exposed Guinea Pigs. *Exp Lung Res*. 2009 Oct; 35(8):631-45.
- 120 FMUSP. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Grupo de Gerenciamento de Resíduos. *Cartilha de orientação de descarte de resíduo no sistema FMUSP-HC*. Diretoria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Diretoria Executiva dos Laboratórios de Investigação Médica (LIMs) do Hospital das Clínicas - FMUSP e Diretoria do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC).
- 121 Gueders MM, Foidart J-M, Noel A, et al. Matrix metalloproteinases of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 8;533(1-3):133-44.
- 122 Spiess K, Teodoro WR, Zorn TMT. Distribution of collagen types I, III and V in pregnant mouse endometrium. *Conect Tissue Res*. 2007;48(2):99-108.
- 123 Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER; ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Feb 15;181(4):394-418.
- 124 Jacob RE, Carson JP, Gideon KM, Amidan BG, Smith CL, Lee KM. Comparison of two quantitative methods of discerning airspace enlargement in smoke-exposed mice. *PLoS One*. 2009 Aug 18;4(8):e6670.
- 125 Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*. 1966 Jul;30(1):23-38.
- 126 Dunnill MS. Quantitative Methods In The Study Of Pulmonary Pathology. *Thorax*. 1962 Dec;17(4):320-8.
- 127 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
- 128 Artachevarria X, Blanco D, Biurrun G, Ceresa M, Pérez-Martín D, Bastarrika G, Torres JP, Zulueta JJ, Montuenga LM, Ortiz-de-Solorzano C, Munoz-

- Barrutia A. Evaluation of micro-CT for emphysema assessment in mice: comparison with non-radiological techniques. *Eur Radiol.* 2010 May;21(5):954-62.
- 129 Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull.* 2008 Jul;31(7):1434-8.
- 130 Harada H, Imamura M, Okunishi K, Nakagome K, Matsumoto T, Sasaki O, Tanaka R, Yamamoto K, Dohi M. Up-regulation of lung dendritic cell functions in elastase-induced emphysema. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;149(suppl 1):25-30.
- 131 Suki B, Stamenovic D, and Hubmayr R. Lung Parenchymal Mechanics. *Compr Physiol.* 2011 Jul;1(3):1317-51.
- 132 Kurimoto E, Miyahara N, Kanehiro A, Waseda K, Taniguchi A, Ikeda G, Koga H, Nishimori H, Tanimoto Y, Kataoka M, Iwakura Y, Gelfand EW, Tanimoto M. IL-17A Is Essential to the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. *Respir Res.* 2013 Jan 20;14:5.
- 133 Black PN, Ching PST, Beaumont B, Ranasinghe S, Taylor G, Merrilees MJ. Changes in elastic fibres in the small airways and alveoli in COPD. *Eur Respir J.* 2008 May;31(5):998-1004.
- 134 Ito S, Ingenito EP, Arold SP, Parameswaran H, Tgavalekos NT, Lutchen KR, Suki B. Tissue heterogeneity in the mouse lung: effects of elastase treatment. *J Appl Physiol.* 2004 Jul;97(1):204-12.
- 135 Robbesom AA, Koenders MMJF, Smits NC, Hafmans T, Versteeg EMM, Bulten J, Veerkamp JH, Dekhuijzen PNR, van Kuppevelt TH. Aberrant fibrillin-1 expression in early emphysematous human lung: a proposed predisposition for emphysema. *Modern Pathology.* 2008 Mar;21(3):297-307.
- 136 Siracusa LD, McGrath R, Ma Q, Moskow JJ, Manne J, Christner PJ, Buchberg AM, Jimenez SA. A tandem duplication within the fibrillin-1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res.* 1996 Apr;6(4):300-13.
- 137 Zacchigna L, Vecchione C, Notte A, Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Cifelli G, Ferrari A, Maffei A, Fabbro C, Braghetta P, Marino G, Selvetella G, Aretini A, Colonnese C, Bettarini U, Russo G, Soligo S, Adorno M, Bonaldo

- P, Volpin D, Piccolo S, Lembo G, Bressan GM. Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*. 2006 Mar 10;124(5):929-42.
- 138 Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 2):S29-32.
- 139 Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem. J*. 1999 May 15;340(Pt 1):171-81.
- 140 Carver PI, Anguiano V, D'Armiento JM, Shiomi T. Mmp1a and Mmp1b are not functional orthologs to human MMP1 in cigarette smoke induced lung disease. *Exp Toxicol Pathol*. 2014 Dec 9. pii: S0940-2993(14)00174-2.